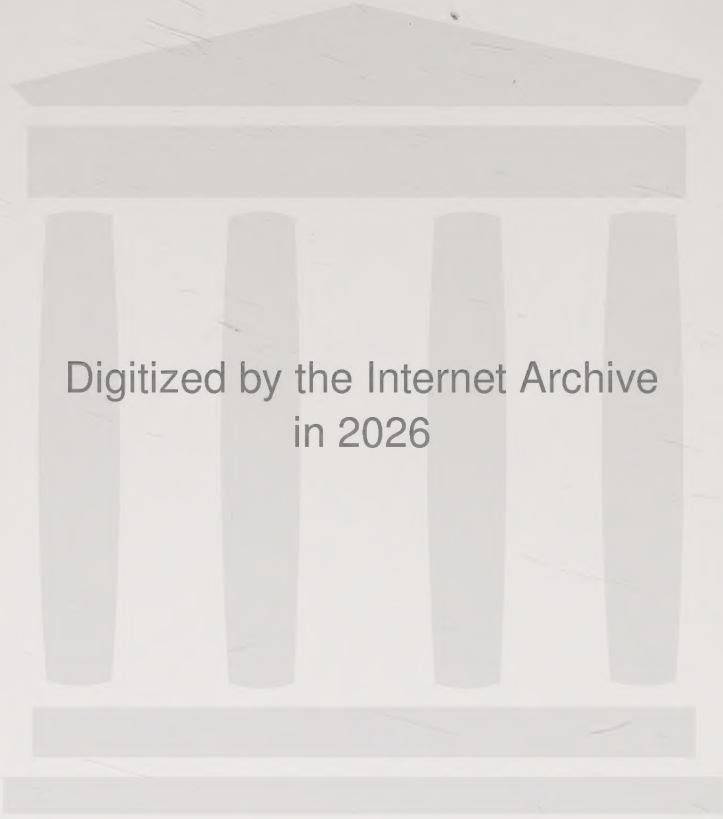
Ueber den Aminosäure-Gehalt der extraembryonalen Flüssigkeiten während der ersten 15 Tage der Hühnerembryogenese.

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Würde eines Doktors der Philosophie
vorgelegt der
Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Universität Basel

1966

von
Sándor Tamás KOVÁCS
Budapest

1967
Heer & Co. Basel


Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546005_0076

Über den Aminosäure-Gehalt der extraembryonalen Flüssigkeiten während der ersten 15 Tage der Hühnerembryogenese.

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der philosophischen Doktorwürde
vorgelegt der
Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Basel

von
Sándor Tamás KOVÁCS
Budapest

Genehmigt von der Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät auf Antrag der

Herren Professoren Dr. Max Brenner und Dr. Adolf Portmann

Basel, den 10. 5. 66.

W. Habicht

Dekan

UNIV. LEIDEN BIBL.

Zenének

Meiner geliebten Grossmutter

Für die aufopfernde Hilfe und das stete Interesse, das die Herren Prof. Dr. M. Brenner und Prof. Dr. A. Portmann meiner Arbeit entgegenbrachten, darf ich ihnen an dieser Stelle meinen Dank aussprechen.

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung

II. Material und Methodik

1. Tiermaterial

2. Gewinnung der extraembryonalen Flüssigkeiten

3. Trockengewicht und Volumenbestimmung der extraembryonalen Flüssigkeiten

4. Fraktionierung der extraembryonalen Flüssigkeiten

a. Dialyse

b. DEAE-Cellulose

c. Gelfiltration auf Sephadex G 25

5. Aminosäurebestimmungen

a. Dinitrophenylierung

b. Dünnschichtchromatographie

c. Semiquantitative Auswertung der Dünnschichtchromatogramme

d. Analyse nach Stein und Moore

III. Ergebnisse

1. Frischgewicht und prozentualer Trockengehalt der extraembryonalen Flüssigkeiten

2. Aufgefundene Aminosäuren und relative Mengenverhältnisse

3. Semiquantitative Beziehungen

a. Relative Kosmopoliten-Konzentration, bezogen auf die jeweilige Kosmopoliten-Konzentration am ersten untersuchten Entwicklungstag. Indexwerte I_F und I_T

b. Relative Kosmopoliten-Mengen. Indexwerte $I_{Fkorr.}$

c. Verlauf von I_F und I_T, sowie I_{Fkorr} (F, T und F_{korr}-Kurven);

Vergleich mit den zeitlichen Veränderungen von Wassergehalt und Trockensubstanz

d. Schätzungen des Aminosäure-Totalgehaltes. Zeitlicher Verlauf innerhalb der Kompartimente (Vergleich mit F_{korr}) und zeitlicher Querschnitt über die Kompartimente.

4. Vergleich der dünnschichtchromatographischen semiquantitativen Analyse von Eiklar mit der säulenchromatographischen quantitativen Analyse nach Stein und Moore.

5. Addendum:

a. Die freien Aminosäuren der Blutflüssigkeit am 10. Entwicklungstag.

b. Die freien Aminosäuren im Eiklar von unbebrüteten Eiern, sowie von unbefruchteten Eiern während einer sterilen Brutzeit von 0-10 Tagen.

IV. Diskussion

1. Bemerkungen zur Methodik

2. Bemerkungen zu den Resultaten

a. Zur Frage der Diffusion zwischen den extraembryonalen Eikompartimenten.

b. Die wahrscheinliche Herkunft der Aminosäuren im Eiklar.

c. Herkunft der Amnionflüssigkeit; Widerlegung der Hypothese von Giacomini.

d. Die Rolle der -SH-Gruppen bei der Morphogenese nach J. Brachet.

e. Zäsuren am 6. (?) und 12. Entwicklungstag

f. Die Existenz zweier Ernährungswege

V. Zusammenfassung

VI. Literatur

I. Einleitung

Die 21 Tage dauernde embryonale Entwicklung des Huhnes bietet ein verlockendes Untersuchungsobjekt im Hinblick auf das biochemische Geschehen der Embryogenese. Diese Entwicklung spielt sich von der Aussenwelt gut abgegrenzt innerhalb einer Kalkschale ab, d.h. innerhalb eines relativ abgeschlossenen Systems. Gegenüber der Embryogenese bei Säugern, wo allerlei Wechselwirkungen und Materialaustausch durch die Placenta zwischen Muttertier und Frucht möglich sind, bedeutet dieser Fall einen Vorteil für den Forscher, der bestimmten Stoffklassen und deren Änderungen während der Embryonalzeit nachzugehen strebt.

Die Ernährung des Embryos ist determiniert durch die im Moment der Eiablage vorliegenden Aufbaustoffe, deren Zusammensetzung sich exakt bestimmen lässt und die nicht mehr den eventuellen Diätänderungen des Muttertieres unterliegt. Die individuelle Variation wird also nicht mehr durch weitere, alimentäre Änderungen kompliziert, wie es z.B. bei den Säugern der Fall ist. Weiterhin liegen auch die Stoffwechselprodukte, ausgenommen vielleicht Kohlendioxyd und Wasser, leicht zugänglich innerhalb der Eischale.

Trotz solcher Vorteile zeigt das Bild über die Hühnerembryogenese noch zahlreiche Unklarheiten. Die Literatur über dieses Gebiet ist nicht frei von widersprechenden Berichten. Die Mannigfaltigkeit der Arbeiten auf diesem Gebiet führt zu einem aus kleinen Mosaikstückchen langsam entstehenden Bild, in dem noch einzelne Steine fehlen, oder andere wieder entfernt werden müssen, weil sie die Ausbildung eines Ganzen stören oder sogar

verhindern.

Die Entstehung der extraembryonalen Flüssigkeiten (Allantois und Amnion) hat lange Diskussionen ausgelöst, die bis heute nicht zufriedenstellend beendet worden sind. Über die Allantoisflüssigkeit wurde behauptet (1), dass sie nicht aus wahrer Exkretion stammt. Dem Amnion hat man auf Grund gewisser pH-Änderungen die Rolle eines embryonalen Urinreservoirs zugeschrieben. Heute weiss man (8, 38), dass die Allantoisausbildung mit der Urnierenbildung (Mesonephros) parallel geht. Die Allantois stellt also einen Sammler für den vom Mesonephros gebildeten Urin dar. - Was für eine Entstehung aber die Amnionflüssgkeit hat, ist heute noch unsicher. Man ist geneigt, sie als ein Transsudat der Umbilicusgefässe (Nabelgefässe) (Area pellucida) aufzufassen (10).

Amnion und Allantois liegen während der ersten Hälfte der Entwicklung je in einem speziell gebildeten Sack voneinander getrennt. Jede ist von einer mehrschichtigen Membran umhüllt. Der Dotter andererseits ist von der sogenannten vitellinen Membran umhüllt und wird im Laufe der Entwicklung noch teilweise vom Blastoderm umwachsen. Dieses letztgenannte Gebilde ist stark durchzogen von Blutgefässen, die im Nabelstrang vereinigt in den Embryo geführt werden. Es lässt noch am 9. Tag eine Dotteroberfläche von der Grösse eines Zweifrankenstückes unbedeckt. Dieses 'Loch', der sogenannte Dottersack-Umbilicus, zieht sich bis zum 15. Tag auf Stecknadelkopfgrösse zusammen. (36) - Die Eiklar-

masse scheint im Gegensatz zu den obengenannten Flüssigkeiten zunächst frein im extraembryonalen Raum vorzuliegen, bis am 12. oder 13. Tag auch hier eine besondere Hülle, der Eiklarsack, gebildet wird. Der Eiklarsack, auch Albuminsack genannnt, kommt durch den mächtigen Zuwachs des Chlorions zustande. Der Eiklarsack (gleich wie der Dottersack) schliesst sich aber nie vollständig; es bleibt in Richtung des benachbarten Amnions eine Öffnung an der korrespondierenden Stelle. Gleichzeitig öffnet sich die Membran um das Amnion, ein Vorgang, den man durch Temperaturerhöhung oder -Senkung beschleunigen oder hemmen kann. - Diese Verhältnisse sind in der Abb. 1 zu sehen.

Es entsteht also ein dreiräumiges kommunizierendes Gebilde (Amnion/Eiklar/Eigelb), dessen physiologische Bedeutung nicht klar ist.

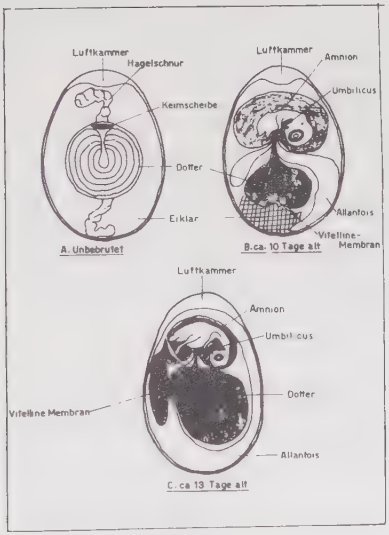
Abb. 1

Drei Phasen der Hühnerentwicklung

a. unbebrütet

b. ca. 10 Tage alt

c. ca. 13 Tage alt; - 'Es entsteht ein dreiräumiges, kommunizierendes Gebilde (Amnion/Eiklar/Eigelb)'.



Die Aminosäureverteilung in den oben geschilderten extraembryonalen Räumen war Untersuchungsobjekt mehrerer Forschergruppen. Eine Anzahl dieser Arbeiten geht schon auf die dreissiger Jahre zurück, wo moderne Methoden, wie z.B. die Chromatographie, noch unbekannt waren (36). Wieder andere, die schon vielleicht mit empfindlicheren Methoden gearbeitet haben, untersuchten willkürlich herausgegriffen das eine oder andere extraembryonale Eikompartiment (15, 39, 42). Solche isolierten Betrachtungen, meist auch auf ein planlos gewähltes Entwicklungsstadium beschränkt, können nach Lage der Dinge keinen Einblick in die erwähnten Zusammenhänge geben. Die stationäre Betrachtung ist durch eine dynamische zu ersetzen, indem eine Stoffverteilung über einen möglichst grossen Ausschnitt aus der Entwicklung verfolgt wird.

Zweck der vorliegenden Arbeit war es, eine Aussage über die zeitlichen Aminosäureveränderungen in den einzelnen durch Membranen getrennten extraembryonalen Eikompartimenten zu gewinnen. Eine entsprechende systematische Untersuchung fehlte bis heute. Wo teilweise systematische Studien bereits vorlagen, rechtfertigte sich deren Wiederholung, weil die heute zur Verfügung stehende Methodik zuverlässigere Resultate liefert. Als Ergebnis der vorliegenden Untersuchung waren vor allem Antworten auf die zum Teil strittigen Fragen zu erhoffen:

1. Enthält das Eiklar freie Aminosäuren?
2. Ist die Transsudat-Hypothese über die Herkunft der Amnionflüssigkeit aus der Area pellucida mit

dem Aminosäuregehalt von Amnion- und Blutflüssigkeit vereinbar?

3. Kann man auf Grund der zeitlichen Veränderung der im extraembryonalen Raum auffindbaren Aminosäuren auf Entwicklungszäsuren der Hühnerembryogenese schliessen?

Schliesslich hat uns noch folgende Frage bewegt:

4. Welches ist die physiologische Erklärung für das vom 13. Tage an zu beobachtende Auftreten von zwei Ernährungswegen (umbilical + oral) und lässt sich dieses Problem mit eiweissanalytischen Methoden bearbeiten?

Zur Illustration der Problematik mögen nachstehende Bemerkungen dienen:

zu 1

Emanuelsson hatte 1951 vergeblich versucht Aminosäuren im Eiklar nachzuweisen. Gestützt auf seine ebenfalls negativen Befunde beim Nachweisversuch proteolytischer Enzyme behauptet er kategorisch: 'in the white, there are no demonstrable free amino acids'. - Nun gibt es aber eine Kontroverse über das Vorkommen von proteolytischen Enzymen im Eiklar (5, 16, 19, 20, 21, 40) und im Jahre 1959 hat Drell im Eiklar von unbebrüteten und selbst unbefruchteten Eiern Asparaginsäure und Glutaminsäure aufgefunden.

zu 2

Die Transsudat-Hypothese von Giacomini aus dem Jahre 1930 (10) ist in das moderne Standardwerk von Romanoff über Vogelembryogenese eingegangen, weil es die wahrscheinlichste ist. Eine weitere Begründung wird nicht gegeben. Mit dem Einbezug der nur bedingt als extraembryonal zu bezeichnenden Blutflüssigkeit in unserer Untersuchung durften wir hoffen, einen Test für diese Hypothese zu finden: bei vasculärer Herkunft der Amnionflüssigkeit sollte sie in ihrem Aminosäuregehalt im grossen und ganzen der Blutflüssigkeit entsprechen.

zu 3 und 4

In der ersten Hälfte der Hühnerembryogenese soll die Ernährung, soweit sie die Aminosäuren betrifft, ausschliesslich auf Kosten des Dottermaterials über ein gut ausgebildetes Adersystem erfolgen (35). Die Aminosäureanalyse des Dotters in verschiedenen Entwicklungsstadien zeigt deutlich eine Schwankung, die mit dem jeweiligen speziellen Bedarf des Embryos (Poolveränderungen) im Zusammenhang stehen mag (35, 42). Während dieser Zeit (bis zum 12. Tag) scheint das Eiklar im extraembryonalen Raum fast intakt zu bleiben. Seine einzige, eindeutig beobachtete Veränderung in dieser Periode ist eine rasch verlaufende Konzentrierung, deren Gang am 6./7. Tag durch Wasserübertritt aus dem Dotter kurz unterbrochen wird; es ist zu diesem Zeitpunkt sogar eine gewisse Wiederverdünnung zu beobachten (36). Die Eiklarkonzentration erfolgt durch eine aktive Wasserentnahme über die Kapillaren der Area vasculosa (31).

In der zweiten Hälfte der Entwicklung entsteht ein völlig anderes Bild. Ca. vom 12. oder 13. Tage an tritt schlagartig Protein in der bisher proteinfreien Amnionflüssigkeit auf (14, 29, 36). Dies ist die Zeit, wo zwischen dem vollentwickelten Eiklarsack und dem Amnion eine Öffnung gebildet wird. (Abb. 1) - Auf Grund der untersuchten Proteingehaltsänderungen glaubt Mc Indoe nachgewiesen zu haben, dass etwa 30% des Eiklares via Eigelb und Dottergefässe vom Embryo assimiliert werden (24 und auch 13). Die anderen 70% müssten also zuerst in das Amnion und von dort in den Embryo gelangen. Diese Vermutung steht im Einklang mit dem oben erwähnten schlagartigen Erscheinen von Eiweiss in der Amnionflüssigkeit. Wenn wir hierbei auf Grund der Stoffbilanz argumentieren , so stützen wir uns auf Needham und andere, die übereinstimmend benaupten, dass das Eiweissmaterial fast vollständig (96%) in das Gewebeeiweiss des Embryos übergehe (8, 25, 35).

Das grundliegende Experiment von Vrbitsch (39) hat schon im Jahre 1924 wahrscheinlich gemacht, dass das ins Amnion gelangte Eiweiss vom Embryo oral aktiv aufgenommen wird. Needham (25) sagt dazu: 'it ist probable that the chick embryo is in position to swallow a good deal of the protein which enters the amniotic cavity at the end of incubation'.

Für den Embryo, der von jetzt an infolge des ins Fruchtwasser eingedrungenen Eiweissmaterials regelrecht in seinen Nähr-

stoffen badet, bestehen nun zwei prinzipiell verschiedenartige Ernährungswege:

1. eine 'konservative' (primäre) embryonale Verdauung durch die Nabelgefässe, wenigstens was die Eiweißstoffe betrifft, und
2. eine 'revolutionäre' (sekundäre) orale Ernährung, bei der die Eiweißstoffe offenbar erst intestinal vom Embryo assimiliert werden.

Die Existenz der zwei Ernährungswege bewog uns, hinter den morphologischen Tatsachen den physiologischen Sinn zu suchen. Welche Eiweißsstoffe des Eiklarmaterials erleiden bevorzugt einen extraembryonalen Abbau und welche bleiben 'verschont', bzw. für eine spätere intestinale Verdauung reserviert?

Mit Hilfe der DEAE-Cellulose sind aus dem Eiklar mehr als 10 Fraktionen isoliert worden (22). Mit der altbekannten elektrophoretischen Auftrennung kann man nur etwa sechs Komponenten unterscheiden. Die DEAE-Cellulose könnte also unter Umständen ein brauchbares Mittel sein, um die obengeschilderte Frage abzuklären.

Um etwa den 12. Tag der Hühnerembryogenese geschieht etwas Sonderbares, ein kraftvoller qualitativer Sprung. Man beobachtet im allgemeinen bei Vogelembryonen morphologisch eine Zäsur in der Ontogenese, worüber Portmann folgendes schreibt: 'In der Embryonalperiode wird etwa um den 11. bis 13. Tag ein Stadium verwirklicht, das wesentliche Züge der gestaltlichen Disposition der reifen Form aufweist und als eine

markante Etappe der Ontogenese aufgefasst werden muss.'(28) Ein Beispiel ist die Tatsache, dass der sich entwickelnde Embryo nun in eine Lage gelangt, in der er seine Nährstoffe auch oral (aktiv) aufnehmen kann.

Wie weit kommt eine solche ontogenetische Zäsur (oder Zäsuren) in den Aminosäureveränderungen der einzelnen extraembryonalen Kompartimente zum Ausdruck? Ein bilanzartiger Vergleich der im extraembryonalen Raum konsumierten (Dotter, Eiklar, Amnion) und ausgeschiedenen Aminosäuren (Allantois und evtl. Amnion?) könnte eventuell einen Index für das embryonale Geschehen in Bezug auf Eiweißstoffe abgeben. Die Eiweißstoffe werden nämlich, wie bekannt, nicht in besonderen Körperdepots kumuliert, wie das bei Zuckern und Fetten der Fall ist, sondern ihrem physiologischen Sinn untergeordnet vom Körper nutzbar gemacht oder unmittelbar ausgeschieden. Die Ausscheidung geschieht zum Teil in Form der Aminosäuren. Zum Zeitpunkt, wo dieser Konsumations / Ausscheidungs-Quotient am grössten ist, dürfte der Embryo im Begriffe sein, seine definitiven Körpereiweisse auszubilden. Wenn z.B. Collagen, das als Stützeiweiß eine funktionelle Rolle hat, vom Embryo synthetisiert wird, sollte die Prolin- und Hydroxyprolin-Exkretion auf ein Minimum sinken, oder sogar ganz aufhören, weil dieses Eiweiß durch einen hohen Gehalt an diesen Aminosäuren charakterisiert ist.

Gelingt es also, mit eiweißanalytischen Methoden eine Zäsur um den 12. Entwicklungstag festzustellen, so erhielte die

von Portmann auf morphologischer Basis postulierte 'markante Etappe' von physiologisch-biochemischer Seite her ihre Bestätigung.

II. Material und Methodik

1. Tiermaterial

Die verwendeten Eier stammen von der Geflügel-Farm AGRUMA, Allschwill, wo die weisse Leghorn- (eventuell Essex) Rasse gezüchtet wird. Die Inkubation der Eier erfolgte in der Geflügel-Farm (im Anfang der Versuche auch in unserem Laboratorium) bei 38° und 60-70 % Luftfeuchtigkeitsgehalt, wobei die Eier in einem automatischen Bebrütungsapparat täglich mehrmals gewendet wurden. Die bebrüteten Eier gelangten entweder sofort zur Bearbeitung (innerhalb von 2 Stunden) oder sie sind sofort bei -4° C bis zur weiteren Aufarbeitung aufbewahrt worden. - Hier müssen wir erwähnen, dass die tiefgefrorenen Eier im Falle der Untersuchung der Amnion- und Allantoisflüssigkeit nicht mehr verwendbar waren, weil die einzelnen Flüssigkeiten nach dem Auftauen sehr vermischt waren. Dies ist auf Membranbeschädigungen zurückzuführen, die beim Einfrieren eintreten. Die Tatsache aber, dass das Eigelb nach dem Tiefrieren nie seine originale, flüssige Konsistenz zurückerlangt hat, sondern einen brüchigen Gelzustand annahm, war bei den Volumenbestimmungen der einzelnen extraembryonalen Kompartimente von grossem Nutzen.

Bei der Beurteilung der Entwicklungsstadien haben wir folgende Kriterien herangezogen:

a. Die von der Geflügel-Farm Agruma strikt eingehaltene Bebrütungsordnung und die uns mitgeteilte Inkubationsdauer.

b. Den morphologischen Vergleich des entwickelten Embryos mit den Stadien von Lillie (18) und Hamburger (11) sowie

c. eine Feuchtgewichtskontrolle des Embryos, bzw. der extraembryonalen Flüssigkeiten (siehe Tabelle).

2. Gewinnung der extraembryonalen Flüssigkeiten

Die gründlich mit einem Wattebausch gereinigten Eier sind in einem Eierbehälter vom spitzen Pol her geöffnet worden, dort wo die Luftkammer während der Inkubationszeit immer einen grösseren Raum zwischen Eischale und Chorion einnimmt. Die Allantois- und Amnionflüssigkeiten sind mit Hilfe einer Tuberkulinspritze und einer Injektionskanüle (2R2 Aiguilles No. 19 oder 20 o,45 mm Ø) aus nicht rostendem Stahl entnommen worden. Die ganze Operation braucht einige Übung. In den späteren Stadien, wo die mächtige Allantois die ganze Keimoberfläche (auch extraembryonal) umwachsen hat, war eine Flüssigkeitsentnahme nach erfolgter Fensteröffnung vom spitzen Pol her ohne weiteres möglich. Hingegen im Frühstadium der Allantois und bei der Entnahme der Amnionflüssigkeit in allen Stadien konnten wir uns eine Freipräparierung nicht ersparen, was am besten in einer Petri- oder Porzellanschale erfolgte.

Die Unterscheidung des Amnions und der Allantois war schon in den ganz frühen Stadien leicht möglich. In der Wand der durchsichtigen Allantios sind nämlich schon ganz früh Blutgefässe zu sehen, die entsprechend der mehrseitigen Funktion der Allantois - im Dienste des Gasaustausches stehen. Die

ebenfalls durchsichtige Amnionmembran dagegen bleibt frei davon.

Die Entnahme des im stumpfen Eipol liegenden Eiklares geschieht ziemlich leicht, wenn man bei der Freipräparierung die vitelline Membran des Dotters (Eigelb) nicht verletzt hat. Die Gewinnung des Eigelbes erfolgt am günstigsten nach 'Hausfrauenart', nach vorsichtigem Abgiessen des Eiklares. Nach erfolgter Inkubation ist aber die vorangehende Entfernung des Embryos und seiner extraembryonalen Membranen unumgänglich.

Eine parallele Blutflüssigkeitsuntersuchung, die in unseren Versuchsplan - im Hinblick auf die Dotter- und Umbilicus-Gefässe als fünftes extraembryonales Kompartiment - gut hineingepasst hätte, wurde wegen der unüberwindbaren methodisch-technischen Schwierigkeiten nur beschränkt und nicht mit den anderen extraembryonalen Flüssigkeiten vergleichend im Laufe der Inkubation durchgeführt. Weder aus einem nach Freipräparierung kanülisierten Gefäss des Umbilicus oder der Carotisgegend, noch nach einer schnell erfolgten Dekapitation konnte auf saubere Weise Blut gewonnen werden. Ebenfalls war eine nach erfolgter Thoraxöffnung unmittelbar ausgeführte Herzpunktion mit einer heparinisierten Spezialkapillare nicht erfolgreich. Bei jeder Form der Blutentnahme schien die Gefahr einer Beimischung von interstitiellen Flüssigkeiten nicht mit Sicherheit ausschliessbar zu sein. Der sauberste Weg für eine Blutgewinnung beim Hühnerembryo war ohne

Zweifel noch die Herzpunktion, wo aber die winzige Ausbeute (1-2 Tropfen Blut) weder experimentell noch ökonomisch Vorteile bot.

An dieser Stelle möchte ich Herrn Professor Dr. E. Undritz bei der Sandoz AG bestens danken, der bei diesem ungelösten Problem mit seinen Mitarbeitern tatkräftig versucht hat Hilfe zu leisten.

Über die verschiedenen operationstechnischen Möglichkeiten am inkubierten Hühnerei wird in einer norwegischen Arbeit berichtet (12). Die Flüssigkeitsproben wurden nach Entnahme sofort weiterverarbeitet, oder bis zur Aufarbeitung unter Alkohol-Zugabe (Endkonzentration ca. 40%) im Kühlschrank 1-2 Tage aufbewahrt.

5. Trockengewicht und Volumenbestimmung der extraembryonalen Flüssigkeiten

Um quantitative Aussagen zu ermöglichen, haben wir die Bestimmung der auch an sich interessanten Trockengewichts- und Volumenänderungen der extraembryonalen Flüssigkeiten vorgenommen. - Die Trockengewichtsbestimmungen erfolgten jedesmal an Hand eines Pools von je 10 Eiern. Die Proben wurden in einem Exsiccator über P_2O_5 im Vacuum bei 58 C^o getrocknet. Es dauerte etwa 10 - 12 Tage bis die Gewichtskonstante eingestellt waren.

Die Volumenbestimmungen der einzelnen extraembryonalen Eikompartimente hat uns gewisse Schwierigkeiten bereitet. Eine

Abb. 2 Die Veränderungen des Flüssigkeitsvolumens des Amnions während der Hühnerembryogenese (Gallus gallus).

Nach Romanoff

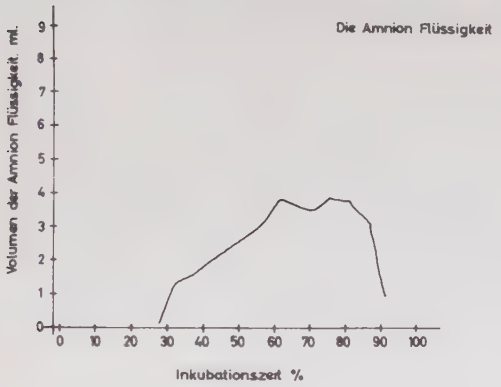
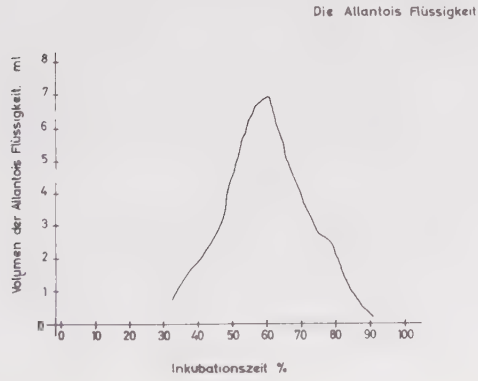


Abb. 3 Die Veränderungen des Flüssigkeitsvolumens der Allantois während der Hühnerembryogenese (Gallus gallus).

Nach Romanoff



theoretisch verlockende Methode für die Volumenbestimmung der Allantois- und Amnionflüssigkeiten war praktisch nicht ausführbar. Es handelt sich hierbei um eine kolorimetrische Messung nach erfolgter Farbstoff-Injektion in die zu bestimmenden Kompartimente. Schon die Wahl eines geeigneten Farbstoffes, der sich in jeder Hinsicht ideal verhält, war nicht leicht. Es kam nämlich nur ein solcher Farbstoff in Frage, der gut wasserlöslich ist, nicht dissoziiert, von den Körperoberflächen nicht adsorbiert wird und ungiftig ist. Von den ausprobierten Farbstoffen schien der geeignetste ein von der Ciba hergestelltes Brillantgrün zu sein, das uns vom farbenchemischen Institut der Universität Basel zur Verfügung gestellt wurde.

Die Bemühungen scheiterten jedoch wegen eines Flüssigkeitsverlustes, der jedesmal eintrat, wenn die Injektion erfolgte. Schliesslich blieb uns nichts anderes übrig, als die Allantois- und Amnionflüssigkeiten vorsichtig in einem Gefäss aufzufangen und zu wägen.

Auf diese Art und Weise haben wir auch die Volumenbestimmungen des Eiklares vorgenommen.

Bei der Bestimmung des Volumens des Eigelbes haben wir uns die bei Tiefgefrierung entstehende irreversible Konsistenzänderung dieses Kompartiments zu Nutze gemacht und es in festem Zustand abgewogen.

Die so ermittelten einzelnen Resultate stimmten für das Amnion und die Allantois mit den von Romanoff angegebenen

Volumensänderungen an diesen zwei Eikompartimenten sehr gut überein (Abb. 3, 4); Literaturangaben über Dotter und Eiklar in dieser Beziehung waren nicht zu finden.

4. Fraktionierung der extraembryonalen Flüssigkeiten

a. Dialyse

Wenn es nötig war, haben wir die Probe eiweissfrei gemacht, indem wir sie dialysierten. Das war der Fall bei der Dialyse des Eiklares, Eigelbes und den dem Amnion entnommenen Proben. Die Dialyse haben wir in einem Dialysierschlauch (Visking Company, Chicago, Iln.) vom Durchmesser o,8 - 1,5 cm durchgeführt. Die dickflüssigen Proben wurden zuerst im Verhältnis 1:1 mit isotonischer Kochsalzlösung (o,9%) verdünnt; das so verdünnte Eiklar wurde vor der Dialyse zur Zerstörung der Struktureiweisse in einem Handhomogenisator nach Potter homogenisiert. Die Dialysen wurden in einem Kühlraum (+4 C^{o}) unter ständigem Rühren gegen isotonische Kochsalzlösung, oder destilliertes Wasser ausgeführt. Das Volumenverhältnis der Dialysierflüssigkeit zur Probe betrug 20:1. Wir haben die Proben 24 Stunden lang dialysiert, wobei die Dialysierflüssigkeit zweimal gewechselt wurde (1. und 2. Charge). Es hat sich nämlich aus zwei vorangehenden Vorversuchen an einer Eigelbprobe ergeben, dass im Mittel in der 1. Charge (nach 12 Stunden) 70%, in der 2. Charge (nach total 24 Stunden) 27%, und in der 3. Charge (nach total 48 Stunden) 3% der unter diesen Bedingungen total ausdialysierten Substanzmenge im

Dialysat erschienen. Nach beendigter Dialyse haben wir die Fraktionen vereinigt und anschliessend in einem Rotationseindampfer eingeengt.

Wie wir später festgestellt haben, waren die Dialysate nicht eindeutig frei von Eiweiss. Selbst nach Eindampfen im Rotationseindampfer (Temperatur bis 80 C^{o}), Aufnehmen der Substanz in der 10fachen Menge Wasser, Zugabe von 1,66 Teilen 96% Alkohol auf 1 Teil Lösung (Endkonzentration 60% Alkohol) und Filtration war die Sulfusalicylprobe im Filtrat schwach positiv. - Auf alle Fälle verursacht die so auf dreifache Weise (Dialyse, Hitzedenaturierung und alkoholische Fällung) enteiweisste Lösung bei der weiteren Analyse - auch im Falle der Analyse nach Stein und Moore (s. weiter unten) - keine unangenehmen Störungen.

b. DEAE-Cellulose

Wie es in der Einleitung skizziert wurde, haben wir versucht, neben den freien Aminosäuren auch die Eiweissbestandteile im extraembryonalen Raum zu analysieren. Dazu wurden wir angeregt durch eine 1960 veröffentlichte Arbeit (22), wo über eine Trennung der Eiklarbestandteile an Säulen von DEAE-Cellulose berichtet wird.
Mehrere Versuche mittels dieser Methode haben jedoch gezeigt, dass die Resultate nicht reproduzierbar waren. Gegenüber der Elektrophorese bedeutet diese Methodik einen gewissen Fortschritt, der aber eher qualitativ als quantitativ ausnützbar

ist.

Wie es sich herausgestellt hat, ist die Nichtreproduzierbarkeit der in der Literatur mitgeteilten Trennungsresultate sehr wahrscheinlich durch die Unzuverlässigkeit der Aktivitätsangaben und die Schwankungen der Korngrösse der im Handel befindlichen DEAE-Cellulose-Marken bedingt.

c. Gelfiltration auf Sephadex G 25

Zur Abtrennung der niedermolekularen Bestandteile von den hochmolekularen kam auch die Gelfiltration auf Sephadex G 25 in Frage (26). Wir haben sie an Eiklar in Parallelversuchen mit der Dialyse ausprobiert. Nach der Dinitrophenylierung der so erhaltenen einzelnen Fraktionen, haben wir auf den Dünnschichtplatten ein weitgehend identisches Bild wie bei den dialysierten Proben erhalten.

Weil die Gelfiltration in unserem Falle keine nennenswerten Vorteile bietet, haben wir uns bei den weiteren Versuchen ausschliesslich der Dialyse für die Abtrennung der niedermolekularen von den hochmolekularen Bestandteilen bedient.

b. Aminosäurebestimmung

a. Dinitrophenylierung

Zur Analyse des freien Aminosäuregehaltes der extraembryonalen Flüssigkeiten haben wir die Dinitrophenylierungsmethode mit nachfolgender Dünnschichtchromatographie gewählt. Sie scheint am besten geeignet zu sein, weil mit dieser Methode die in

jedem biologischen Material störenden Salze leicht ausschaltbar sind. Wir haben uns der Vorschrift, die von Brenner und Mitarbeitern ausgearbeitet wurde, bedient (41). Die eiweissfreien Flüssigkeiten (Allantois, Amnion bis zum 12. Tag) wurden unmittelbar eingesetzt. Bei den eiweisshaltigen (Blut, Eiklar und Eigelb, sowie Amnion vom 12. Tage an) war eine Enteiweissung durch Alkoholzugabe (Endkonzentration 40% bei Blut und Amnion vom 12. Tage an) bzw. eine Dialyse, gefolgt von Alkoholzugabe (Endkonzentration 40% bei Eiklar und Eigelb) erforderlich.
Die eiweissfreien bzw. enteiweissten Flüssigkeiten wurden entweder direkt oder nach Eindampfen und Wiederauflösen in 10 cm^3 Wasser der Dinitrophenylierung unterworfen. Nachstehende Tabelle gibt Auskunft über

die pro Analyse verarbeiteten Mengen,

die Form in welcher die Probe zur Dinitrophenylierung gebracht wurde und

die Menge 2,4-Dinitrofluorbenzol-Lösung (10% (g/v) abs. alkoholische Lösung), die jeweils einzusetzen war.

Die Dinitrophenylierung erfolgte im alkalischen Milieu. Die Proben wurden zuerst tropfenweise vorsichtig mit 5 n NaOH in Gegenwart von Phenolphtaleinpapier bis zur schwachen Rosafärbung alkalisch gemacht, so dass mit 5 ml Karbonatpuffer* und schliesslich mit 2,4-Dinitrofluorbenzol-Lösung versetzt.

*Karbonatpuffer 8,4 $NaHCO_3$ (nicht erwärmen) und 2,5 ml 1 n NaOH mit H_2O auf 100 ml verdünnt pH 8,8

Tab. 1 Vorbehandlung der Aminosäureproben und Mengenverhältnisse bei der Dinitrophenylierung

Material	Entwicklungs-stadium	Einges. Menge	Form	Entwicklungs-stadium	Einges. Menge DNFB-Lösung
Eigelb	3-15 Tag	20 gr	enteiweisster Rückstand in 10 ml H_2O gelöst	3-15 Tag	2 ml
Eiklar	3-15 Tag	10 gr	enteiweisster Rückstand in 10 ml H_2O gelöst	3 Tag 6-15 Tag	1 ml 2 ml
Amnion	6 Tag 9 Tag	1 gr 2,5gr	tel quel in 10 ml Endvol.	6 Tag 9 Tag	1 ml
	12 Tag	10 gr	enteiweisster Rückstand in 10 ml H_2O gelöst	12 Tag 15 Tag	1 ml 2 ml
Allantois	6 Tag 9 Tag 12 Tag 15 Tag	1,5 gr 20,0 gr 20,0 gr 5,0 gr	tel quel in 10 ml Endvol.	6-15 Tag	1 ml
Blut	10 Tag	2 gr	enteiweisster Rückstand in 10 ml H_2O gelöst	10 Tag	1,5 ml

Die so gebildete milchige Emulsion wurde in einer braunen Flasche eine Stunde lang in einem Wasserbad von 40 C^{o} geschüttelt und nach Vorschrift (41) weiter behandelt.
Nach unserer Erfahrung kann man die im Scheidetrichter beim Atherauszug meistens auftretende, unangenehme Schaumbildung reduzieren oder sogar ganz vermeiden, wenn man die frischentnommenen Flüssigkeiten zuerst durch Eindampfen im Rotationseindampfer einer Art Denaturierung unterwirft. Den Rückstand kann man nachher im Wasser aufnehmen und wie üblich dinitrophenylieren. Damit vermeidet man einen Materialverlust, der bei der Phasentrennung wegen Einschlüssen in der mit Luftblasen beladenen schleimstoffartigen Zwischenschicht auftreten kann.
Die so gewonnenen ätherlöslichen Dinitrophenyl- (=DNP-) Aminosäuren haben wir in kleinen Präparationsgläschen unter Lichtausschluss kühl aufbewahrt.

b. Dünnschichtchromatographie

Die Qualität der verwendeten Dünnschichtplatten, besonders der Feuchtigkeitsgehalt, die Schichtdicke, Korngrösse und Homogenität spielten eine grosse Rolle. Die im Anfang auftretenden Schwankungen wurden durch standardisiertes Trocknen der von uns selber hergestellten und aufbewahrten Platten weitgehend behoben. Bei der Qualität der verwendeten Kieselgels haben wir uns zu Gunsten des feinkörnigeren Kieselgel G MERCK entschieden.

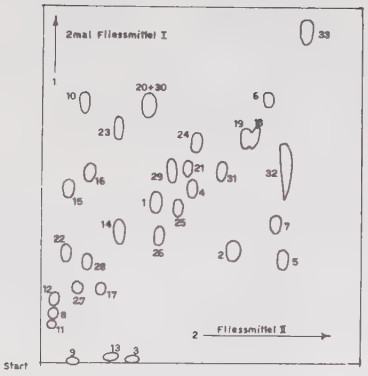
Zum Auftragen der in Aceton gelösten DNP-Aminosäure-Proben haben wir mit bestem Erfolg eine scharf gespitzte Mikropipette gebraucht; die stumpfen waren weniger geeignet. Eine schnelle Arbeit ist hier wegen der Flüchtigkeit des Acetons unbedingt notwendig, da sons bei der quantitativen Auswertung ein grober Fehler auftreten kann.
Möglichst bei allen Untersuchungen haben wir eine Standardmischung parallel chromatographiert, und mit Hilfe der so erhaltenen Fleckenmuster unsere Unbekannte identifiziert (41). Die Chromatogramme sind zweidimensional entwickelt worden. Zuerst haben wir im Fliessmittel I [Toluol/2-Chloräthanol/Pyridin/25 proz. Ammoniak (50:35:15:7 v/v)] nach Angaben von Brenner und Mitarbeitern (2, 41) chromatographiert, dann 5 Min. getrocknet (Schicht wird weiss) und anschliessend wieder im gleichen Fliessmittel in gleicher Laufrichtung noch einmal chromatographiert. Die darauffolgende erforderliche zweite Zwischentrocknung wurde genau eingehalten (10 Min. Luftzug, 10 Min. Heizschrank bei 60 C^{o}, 10 Min. Luftzug). Schliesslich wurde im Fliessmittel II [Chloroform/Benzylalkohol/Eisessig (70:30:3 v/v)] chromatographiert. Es empfiehlt sich, die Fliessmittel in den Trögen oft zu wechseln, sonst werden die Lösungsmittelvernältnisse besonders bei Fliessmittel II mit der Zeit stark verschoben, was unter anderem z.B. in der Verlängerung der Laufzeit von 120 bis zu 180 Min. zum Ausdruck kam. Wir haben ausschliesslich Lösungsmittel 'für Chromatographie' benutzt.

Tab. 2 Ätherlosliche DNP-Aminosäuren

Numeriert nach Brenner und Mitarbeitern

DNP-Aminosäure	No.	Abkürzung
DNP-Alanin	1	Ala
DNP-β-Alanin	2	β-Ala
DNP-λ-Aminoadipinsäure	3	Aad
DNP-α-Aminobuttersäure	4	Abut
DNP-γ-Aminobuttersäure	5	γ-Abut
DNP-λ-Aminocaprylsäure	6	Acy
DNP-β-Aminoisobuttersäure	7	β-AiB
DNP-Asparagin	8	Asp(NH_2)
DNP-Asparaginsäure	9	Asp
Di-DNP-Cystein	10	Cys
Di-DNP-Cystin	11	(Cys_2)
DNP-Glutamin	12	Glu(NH_2)
DNP-Glutaminsäure	13	Glu
DNP-Glycin	14	Gly
Di-DNP-Histidin	15	His
Di-DNP-Hydroxylysin	16	Hylys
DNP-Hydroxyprolin	17	Hypro
DNP-Isoleucin	18	Ileu
DNP-Leucin	19	Leu
Di-DNP-Lysin	20	Lys
DNP-Methionin	21	Met
DNP-Methioninsulphon	22	$MetO_2$
Di-DNP-Ornithin	23	Orn
DNP-Phenylalanin	24	Phe
DNP-Prolin	25	Pro
DNP-Sarkosin	26	Sar
DNP-Serin	27	Ser
DNP-Threonin	28	Thr
DNP-Tryptophan	29	Try
Di-DNP-Tyrosin	30	Tyr
DNP-Valin	31	Val
2,4-Dinitrophenol	32	DNP-OH
2,4-Dinitroanilin	33	DNP-NH_2

Abb. 4 Fleckenmuster der ätherlöslichen DNP-Aminosäuren
Die Nummern entsprechen der Numerierung der
DNP-Derivate in der Tabelle 1.



1) Oberer u. rechter Bildrand entsprechen den Fliessmittelfronten.

Die Chromatogramme sind lichtempfindlich. Deshalb empfiehlt sich ein sofortiges Durchpausen auf Pergaminpapier, was am besten unter Beobachtung im kurzwelligen UV-Licht geschieht; Näheres darüber und über UV-Photographie nach 41.

Ist ein Fleck des erhaltenen Fleckenplanes nicht eindeutig einem bekannten DNP-Aminosäurefleck zuzuordnen, so muss man ihn mit der umliegenden Schicht zusammen vorsichtig von der Platte abheben und die Substanz mit Aceton + Eisessig (1-2 Tropfen) eluieren. Dies geschieht am günstigsten mit Hilfe eines mit Celite präparierten kleinen Nutschkopfes, wobei ein schwaches Vacuum angewendet wird. Ein weiteres parallel mit bekannten DNP-Aminosäuren ausgeführtes eindimensionales Chromatogramm gibt dann Auskunft über die Identität der abgetrennten Unbekannten.
Die in Frage stehenden DNP-Aminosäuren und ein dazugehöriges Fleckenmuster sind in der Tabelle 2. und Abbildung 2. angegeben. Wir haben die Numerierung der DNP-Aminosäuren von Brenner und Mitarbeitern übernommen.

c. Semiquantitative Auswertung der Dünnschichtchromatographie

Um die qualitativ sehr bewährte Dünnschichtchromatographie in unserem Falle auch für quantitative Bestimmungen nutzbar zu machen, haben wir folgende Überlegungen angestellt.
Wenn wir ein optimales Chromatogramm herstellen wollen, d.h.

ein solches, auf dem die schwächsten Flecken möglichst noch sichtbar und die stärksten gleichwohl voneinander gut getrennt sind, müssen wir erfahrungsgemäss so viel Substanz applizieren, dass pro DNP-Aminosäuren im Mittel etwa 4 γ vorhanden sind. Diese erforderliche Menge wurde jedesmal auf Grund einer chromatographischen Verdünnungsreihe empirisch ermittelt. Um unseren Gedankengang besser zu erläutern, soll der folgende Fall als Beispiel dienen:

Von 6 Tage lang bebrüteten Eiern haben wir 20,0 g Eigelb gesammelt und dinitrophenyliert. Die erhaltene Menge an dinitrophenylierter Substanz (DNP-Aminosäuren + Nebenprodukte) wurde mit Aceton bis zum Gesamtvolumen von 1 ml verdünnt. Es wurden dann von dieser Stammlösung geometrisch ansteigende Volumina (0,5, 1, 2, 4, 8 ul pro Startpunkt) auf insgesamt 5 Platten aufgetragen. Zweidimensionale Chromatographie lieferte bei der Platte mit dem Auftragsvolumen 1 ul (= 1 % des Gesamtvolumens) des beste Chromatogramm; dieses wurde ausgewertet. - Wir könnten davon 20 verschiedene DNP-Aminosäuren identifizieren, deren Gesamtmenge nach dem Gesagten auf etwa 20 x 4 = 80 γ geschätzt wurde. Unsere Stammlösung sollte also, weil wir 1 % davon aufgetragen haben, etwa 8 mg DNP-Aminosäuren enthalten. Weil diese Menge aus 20 gr frischem Eigelb gewonnen worden war, musste sie nun noch auf den durchschnittlichen Eigelbgehalt von 6 Tage lang bebrüteten Eiern (21,68 gr) umgerechnet werden. So konnten wir die an diesem Entwicklungstag pro Eigelb effektiv vorhandenen Aminosäuremengen ungefähr

angeben. Aus dieser Berechnung ergab sich für dieses Eikompartimentes am 6. Entwicklungstag ein Total von 8,62 mg freien Aminosäuren.

d. Analyse nach Stein und Moore

Diese Analyse wurde freundlicherweise vom Aminosäurelabor des Kinderspitals Basel durchgeführt.* Sie diente gleichzeitig als Kontrolle für unsere semiquantitative dünnschichtchromatographische Methode.
Die sorgfältig eiweissfrei gemachten Proben wurden an Amberlite IR-120-Kolonnen nach S. Moore und W.H. Stein analysiert (25, 57).
Die in einer 150 cm langen Kolonne eines Durchmessers von 0,9 cm bei 50 C^{o} analysierten sauren Aminosäuren sind mit 0,2 n Na-Citrat-Puffer im Anfang bei pH 3,25 und darauffolgend bei pH 4,25 in einem 24stündigen Arbeitsgang analysiert worden. Die Durchflussgeschwindigkeit betrug 12-14 ml pro Stunde, der Pufferwechsel erfolgte bei etwa 260 ml. - Die Analyse der basischen Bestandteile benötigte hingegen nur 5 Stunden auf einer 15 cm langen Kolonne vom 0,9 cm Durchmesser, ebenfalls bei 50 C^{o}. Hier wurden die Aminosäuren bei pH 5,28 bei einer Durchflussgeschwindigkeit von 25-30 ml pro Stunde eluiert. Die einzelnen Aminosäurefraktionen wurden photometrisch mit Hilfe des Ninhydrin-Reagens registriert. Einzelheiten findet man in der Originalliteratur (25, 57).

*An dieser Stelle bedanke ich mich bei Herrn R. Weber für die geleistete Arbeit.

III. Ergebnisse

1. Frischgewicht und prozentualer Trockengehalt der extraembryonalen Flüssigkeiten

Zu Beginn bestimmten wir die Volumensänderungen der extraembryonalen Flüssigkeiten während der Hühnerembryogenese. Gleichzeitig haben wir auch den prozentualen Trockensubstanzgehalt der einzelnen Eikompartimente (Eigelb, Eiklar, Amnion und Allantois) und seine Veränderung ermittelt.

Tabelle 3 zeigt die Resultate unserer systematisch durchgeführten Messungen über die Frischgewichtsänderungen; für das Amnion und die Allantois vergleiche man die mit den unseren gut übereinstimmenden Werte von Romanoff (Abb. 2 und 3).

Wie über die Frischgewichte, so finden sich auch über die prozentualen Trockensubstanzgehalt-Änderungen der extraembryonalen Flüssigkeiten in der Literatur nur lückenhafte Daten. Die Angaben von K.A. Drel z.B. beschränken sich auf Eigelb und Eiklar (3). - Unsere Werte, zusammengestellt in der Tabelle 4, zeigen einige Abweichungen gegenüber jenen von K.A. Drel.

2. Aufgefundene Aminosäuren und relative Mengenverhältnisse

Unser nächster Schritt war, die Verhältnisse des freien Aminosäuregehaltes von den einzelnen extraembryonalen Eikompartimenten vergleichend zu untersuchen. Dies geschah beim Eigelb und Eiklar nach einer Entwicklungszeit von 3, 6, 9, 12 und 15

Tagen, beim Amnion und der Allantois nach 6, 9, 12 und 15 Tagen. - Die Feststellung der freien Aminosäuren in den einzelnen Kompartimenten erfolgte mit der beschriebenen Methodik durch Dinitrophenylierung und Chromatographie auf der Dünnschichtplatte. Wir haben je 10 Eier verwendet und davon die einzelnen Flüssigkeiten entnommen. Eigelb und Eiklar standen reichlich zur Verfügung. Dies war aber nicht der Fall bei den Amnion- und Allantoisflüssigkeiten, wo wir bestrebt waren, möglichst ein Maximum des spärlich gewinnbaren Materials zu bearbeiten. Die optimale Menge der ätherlöslichen DNP-Aminosäuren, die auf die Dünnschichtplatte aufgetragen wurden, wurde jeweils empirisch ermittelt (Vgl. methodischen Teil).

Tab. 3 Frischgewichte der extraembryonalen Flüssigkeiten während der Hühnerembryogenese.

	Ganzes Ei in gr	Eigelb gr	%	Eiklar gr	%	Amnion gr	%	Allantois gr	%
3tägig	57,47	18,56	32,3	30,70	53,4	-	-	-	-
6tägig	55,54	21,68	39,1	11,91	21,5	0,51	0,93	0,82	1,47
9tägig	56,31	31,86	56,6	9,77	17,4	1,52	2,70	1,81	3,21
12tägig	55,60	20,61	37,0	10,62	19,3	3,71	6,67	7,09	12,7
15tägig	51,01	15,97	31,4	2,18	4,27	2,84	5,57	5,17	10,01

Tab. 4 Prozentualer Trockensubstanzgehalt der extraembryonalen Flüssigkeiten während der Hühnerembryogenese.

Tage	Eigelb	Eiklar	Amnion	Allantois
0. Tag	46,2 (48,4*)	14,0 (11,9*)	-	-
3. Tag	44,3	15,4	-	-
6. Tag	27,3	29,1	0,30	0,37
9. Tag	21,3	35,6	0,77	0,87
12. Tag	34,3	35,2	1,22	1,20
15. Tag	27,8 (46,6*)	36,3 (39,3*)	15,10	1,11

* Werte von K.A. Drel

Tab. 5 Die nachgewiesenen ätherlöslichen DNP- Aminosäuren aus den extraembryonalen Flüssigkeiten des Huhnes nach 3, 6, 9, 12 und 15 Entwicklungstagen.

3. Entwicklungstag:

	Eigelb	Eiklar	
Ala	+++	+	
Asp	++	+	
Cys_2	++	-	
$Glu^2(NH_2)$	-	-	
Glu	++	+	Amnion und Allan-
Gly	++	++	tois sind noch
His	-	-	nicht bestimmbar
Hypro	-	-	
Ileu-Leu	++	+++	
Lys-Tyr	+++	+	
Met O_2	Sp (?)	-	
Orn	Sp (?)	Sp (?)	
Phe	++	+++	
Pro	++	++	
Ser	+++	++	
Thr	++	++	
Try	+	+	
Val	++	++	
Zahl der Aminosren	15	13	

6. Entwicklungstag:

	Eigelb	Eiklar	Amnion	Allantois
Ala	+++	+++	++	+++
Asp (NH_2)	++	-	-	-
Asp	+++	+++	-	-
Cys_2	++	-	-	-
$Glu^2(NH_2)$	+++	+++	+++	+++
Glu	+++	+++	-	-
Gly	+++	++	-	++
His	+	-	-	+
Hypro	+	-	-	+
Ile-Leu	+++	+++	-	++
Lys-Tyr	+++	+++	+++	+++
$MetO_2$	+	-	-	-
Orn	+	+	-	++
Phe	+++	+++	-	++
Pro	+++	+++	-	+++
Ser	+++	+++	++	+++
Thr	+++	+++	-	+++
Try	++	+	-	++
Val	+++	+++	-	++
Zahl der Aminosren	19	14	4	13

Fortsetzung zu Tab. 5

9. Entwicklungstag:

	Eigelb	Eiklar	Amnion	Allantois
Ala	+++	+++	+++	+++
ß-Ala	-	-	-	+
Asp (NH_2)	+	-	-	-
Asp	+	++	-	-
Cys_2	++	-	-	-
Glu(NH_2)	+	++	+++	+++
Glu	++	+++	-	-
Gly	+++	++	+++	++
His	+	-	-	+
Hypro	-	-	-	+
Ileu-Leu	+++	+++	++	++
Lys-Tyr	+++	+++	+++	+++
$MetO_2$	-	-	-	+
Orn	+	Sp (?)	-	+
Phe	+++	+++	++	+
Pro	+++	+++	+	+++
Ser	+++	+++(stark)	+++	+++
Thr	+++	+++	+++	+++
Try	++	-	-	+
Val	+++	+++	+++	+
Zahl der Aminosren	17	14	10	16

12. Entwicklungstag:

	Eigelb	Eiklar	Amnion	Allantois
Ala	++	+++	+++	+++
Asp	+	+++	-	-
Cys_2	+	-	-	-
Glu^2(NH_2)	-	++	+++	+++
Glu	++	+++	-	-
Gly	++	++	++	+++
His	+	-	-	++
Hypro	-	-	Sp (?)	+
Ileu-Leu	+++	++	+++	++
Lys-Tyr	+++	+++	+++	+++
Orn	-	Sp (?)	-	++
Phe	++	+	++	++
Pro	+++	+++	+++	+++
Ser	+++	++	++	+++
Thr	++	++	+++	+++
Try	+	+	-	+
Val	+++	+++	+++	++
Unbekannt	-	-	-	+ . + (2)
Zahl der Aminosren	14	14	12	16

Fortsetzung zu Tab. 5

15. Entwicklungstag

	Eigelb	Eiklar	Amnion	Allantois
Ala	+++	+++	+++	++
ß-Ala	-	-	-	+
Asp (NH_2)	-	-	-	+++
Asp	+++	+++	+	+
Cys_2	-	-	-	+
Glu(NH_2)	++	++	+++	+++
Glu	+++	+++	-	Sp (?)
Gly	++	++	++	+++
His	++	-	-	+
Hylys	-	-	-	++
Hypro	-	-	+	+
Ileu-Leu	+++	+++	++	++
Lys-Tyr	+++	+++	+++	+++
$MetO_2$	-	-	-	++
Orn	-	Sp(?)	-	+
Phe	++	+++	++	+
Pro	+++	+++	++	++
Ser	+++	+++(stark)	+++	+++
Thr	++	+++	+++	++
Try	+	-	+	-
Val	+++	+++	+++	++
Unbekannt	-	-	-	+ . + (2)
Zahl der Aminosren	14	13	13	29

Die nach Inkubationszeiten von 3, 6, 9, 12 und 15 Tagen gefundenen Aminosäuren sind in der Tabelle 5 zusammengestellt. In der Tabelle haben wir der Einfachheit halber die DNP-Aminosäuren nur mit ihrer üblichen Abkürzung bezeichnet. Die vorhandene Menge an einzelnen DNP-Aminosäuren ist je nach der Intensität der Flecken mit 1, 2 oder 3 Kreuzen (+), oder wo nur Spuren gefunden wurden, mit der Abkürzung Sp. (?) angegeben.

Bei der Auswertung der Chromatogramme haben wir an der Stelle von Di-DNP-Lysin und Di-DNP-Tyrosin einen auffallend intensiven Fleck gefunden. Nach langen Untersuchungen, (Isolierung der Substanz von der Platte und Hydrolysieren) hat sich herausgestellt, daß er für den Fall der Allantoisflüssigkeit auf der Anwesenheit von vorwiegend Di-DNP-Lysin beruht. Bei anderen Chromatogrammen, die an der gleichen Stelle einen intensiven Fleck aufweisen, können wir mit gutem Grund ebenfalls annehmen, daß es sich überwiegend um Di-DNP-Lysin handelt.

Es ist aus der Tabelle 5 schon bei Betrachtung der Zahl der einzelnen auftretenden Aminosäuren ersichtlich, daß während der embryonalen Entwicklung des Huhnes die extraembryonalen Flüssigkeiten, was den freien Aminosäuregehalt betrifft, ziemlich

Änderungen zeigen. - Nach den vorliegenden Resultaten gibt es Aminosäuren, die neben den allgemein verbreiteten in dem einen oder dem anderen extraembryonalen Eikompartiment mit gewisser Bevorzugung erscheinen.

So fehlte Ornithin in jeder Entwicklungsphase in der Amnionflüssigkeit, hingegen war es in der Allantois immer nachweisbar.

Die Monoaminodicarbonsäuren (Asparagin- und Glutaminsäure) waren für das Eigelb und Eiklar charakteristisch, mit der Einschränkung allerdings, daß am 15. Entwicklungstage Asparaginsäure auch im Amnion und in der Allantois, sowie Glutaminsäure spurenweise in der Allantois nachweisbar sind.

Die Monoamide der Dicarbonsäuren (Glutamin und Asparagin) fehlen noch am 3. Tag vom Eiklar und Eigelb. - Asparagin tritt am 6. und 9. Tag nur im Eigelb auf, nachher verschwindet es von dort. Am 15. Tag tritt es wieder in der Allantois in Erscheinung. - Glutamin erscheint am 6. Tag in allen untersuchten Flüssigkeiten gleichzeitig, nimmt nachher im Eigelb gegen den 9. Tag allmählich ab und tritt nach einem vorübergehenden Fehlen am 12. Tag dort wieder nachweisbar auf.

Prolin scheint mit Ausnahme des Amnions in allen untersuchten Eikompartimenten reichlich vorzukommen. Im Amnion erscheint es erst in der zweiten Hälfte der Entwicklung, aber in merkbar kleinerer Konzentration als anderswo. - Hydroxyprolin tritt im Amnion etwa gleichzeitig mit dem Prolin auf. In der Allantois ist es stets vorhanden, dagegen fehlt es immer im Eiklar. Im Eigelb konnten wir es nur am 6. Tag nachweisen.

ß-Alanin war nur am 9. und 15. Tag und ebenfalls Hydroxylysin nur am 15. Tag in der Allantois vorhanden.

Von den Hydroxyaminosäuren scheint Threonin nur ein einziges-mal, am 6. Tag im Amnion zu fehlen, sonst ist es immer vorhanden, wenn auch in scheinbar kleinerer Konzentration als sein Verwandter, das Serin. Serin gehört schon zu der "Kosmopoliten-Gruppe", worunter wir die während der Hühnerembryogenese in allen untersuchten Eikompartimenten immer mehr oder weniger intensiv nachweisbaren Aminosäuren verstehen. Hierher gehören Alanin, Glycin, Isoleucin-Leucin, Lysin-Tyrosin, Phenylalanin und Valin. (Glycin, Isoleucin-Leucin, Phenylalanin und Valin scheinen im Amnion am 6. Tag noch zu fehlen.)

3. Semiquantitative Beziehungen

Wir haben unter II/5c ausgeführt, wie man durch semiquantitative Auswertung von Dünnschichtchromatogrammen zu Schätzungen über die in einen Analyseprobe enthaltene Aminosäuregesamtmenge gelangen kann. Im Abschnitt III/3d werden wir hiervon Gebrauch machen um absolute Aminosäure-Gehalte anzugeben. Das Verfahren entbehrt indessen nicht einer gewissen Willkür. Es erscheint deshalb wünschenswert, die Analysenresultate noch in anderer Weise zu verarbeiten. Man kann dies tun, indem man sich auf eine Betrachtung der Gruppe der "Kosmopoliten" beschränkt. Als "Kosmopoliten" haben wir im vorangehenden Kapitel die Aminosäuren bezeichnet, welche "in allen untersuchten Eikompartimente immer mehr oder weniger intensiv nachweisbar" sind. Die zeitlichen Veränderungen, welche die "Kosmopoliten-Gruppe" als Ganzes erleidet, sind mit größerer Sicherheit als die Veränderungen im Aminosäure-Totalgehalt erfaßbar und bieten entwicklungsphysiologisch ebenfalls gewisse Anhaltspunkte.

Die Veränderungen der Kosmopoliten-Konzentrationen in den einzelnen Eikompartimenten bilden Gegenstand des nachstehenden Abschnittes III/3a, jene der Kosmopoliten-Mengen Gegenstand

des Abschnittes III/3b. Die Diskussion der Resultate von III/3a und III/3b im darauffolgenden Abschnitt III/3c stützt sich zweckmäßig auf einen Vergleich mit den zeitlichen Veränderungen des Wassergehaltes und der Trockensubstanz in den untersuchten Kompartimenten. Das hierzu benötigte zusätzliche Zahlenmaterial findet sich bereits im Abschnitt III/1. Seine Verarbeitung erfolgte nach den Angaben in Tabelle 10, Abschnitt III/3c.

Die absoluten Aminosäuregehalte nach III/3d zeigen in ihrem zeitlichen Verlauf ähnliche Tendenzen, wie die Kosmopoliten-Mengen nach III/3c; gewisse Abweichungen haben im Hinblick auf die Unsicherheit der Schätzungen keine allzu große Bedeutung. Interessanter sind die zeitlichen Querschnitte, die sich durch Vergleiche zwischen den Aminosäuregehalten (und Trockengehalten) von Eigelb mit jenen von Eiklar, Amnion und Allantois ergeben (Abb. 13,14).

a. Relative Kosmopoliten-Konzentrationen, bezogen auf die jeweilige Kosmopoliten-Konzentration am ersten untersuchten Entwicklungstag.

Indexwerte I_F und I_T.

Zum Vergleich der Kosmopoliten-Konzentrationen in den verschiedenen Entwicklungsstadien eines gegebenen Eikompartimentes kann man von einem Vergleich derjenigen Anteile der verschiedenen DNP-Aminosäure-Stammlösungen ausgehen, die zur Erzielung optimaler Kosmopoliten-Chromatogramme erforderlich waren. Es sind die gleichen Anteile, welche die "optimalen" Chromatogramme liefern (Vergl.Tab. 6-9). Voraussetzung ist natürlich, daß vom betreffenden Eikompartiment in jedem Entwicklungsstadium gleiche Mengen analysiert werden. - Im Falle von Eigelb - wir führen es wiederum wie im Abschnitt II/5c als Beispiel an - betragen die genannten Anteile bei Proben vom 3, 6, 9, 12.und 15. Tag 0,6%, 1%, 1%, 2% und 2% (s. Tab. 6). Die Kosmopoliten-Konzentrationen in den analysierten Proben sind den reziproken Werten dieser Prozentzahlen proportional. Wenn wir sie für den 3. Tag gleich 1 setzen, so ergeben sich für die verschiedenen Entwicklungsstadien die nachstehenden relativen Kosmopoliten-Konzentrationen, die wir mit dem Symbol I_F (= auf Frischgewicht bezogener Kosmopoliten-Index) bezeichnen:

Stadium	I_F
3. Tag	$\frac{1}{\frac{0,6\%}{1}} = 1$
6. Tag	$\frac{1}{\frac{1\%}{1}} = 0,6$
9. Tag	$\frac{1}{\frac{1\%}{1}} = 0,6$
12. Tag	$\frac{1}{\frac{2\%}{1}} = 0,3$
15. Tag	$\frac{1}{\frac{2\%}{1}} = 0,3$

In der selben Weise haben wir auch die Analysenresultate der übrigen extraembryonalen Flüssigkeiten ausgewertet (Tabellen 6-9).

Durch Multiplikation von I_F mit einem Quotienten $\left[\frac{G}{G_x}\right]$, wobei G und G_x die Trockengewichte der am ersten untersuchten und am x. Tag entnommenen Kompartimentsproben bedeuten, erhält man

$$I_T = I_F\left[\frac{G}{G_x}\right],$$

d.h. einen Index für die relativen Kosmopoliten-Konzentrationen in der Trockensubstanz, bezogen auf die Kosmopoliten-Konzentration in der Trockensubstanz am ersten untersuchten Entwicklungstag. Durch diese Rechnung ergeben sich die Werte I_T (= auf Trockengewicht bezogener Kosmopoliten-Index) vom Eigelb am 3. 6. 9. 12. und 15. Entwicklungstag zu 1,0, 0,97, 1,25, 0,39 und 0,48 (Tabellen 6-9).

Wir haben nun zwei Reihen von Verhältniszahlen I_F und I_T, die uns eine annähernde Vorstellung darüber geben, wie sich während der Embryogenese die Konzentrationen an Kosmopoliten im Eigelb verändern. -

Entsprechende Reihen orientieren über diese Veränderungen in den anderen extraembryonalen Flüssigkeiten: Tab. 6-9 und Abb. 5, 7, 9 und 11.

b. Relative Kosmopoliten-Mengen. Indexwerte $I_{Fkorr.}$

Die totalen Frischgewichte und die totalen Trockenrückstände der extraembryonalen Flüssigkeiten unterliegen einer ständigen Veränderung. Deshalb drücken die Indexwerte I_F und I_T keine absoluten Tendenzen aus. Letztere werden erst sichtbar, wenn man die I_F Werte mit einem Quotienten $\left[\frac{M_{Ex}}{M_E}\right]$ multipliziert, welcher aus der im betreffenden Kompartiment im Entwicklungsstadium x effektiv enthaltenen Substanzmenge M_{ex} (Tab. 3) und der im gleichen Kompartiment am ersten untersuchten Entwicklungstag vorhandenen Substanzmenge M_E gebildet werden kann. Die Produkte

$$I_F \frac{M_{Ex}}{M_E} = I_{Fkorr}$$

stellen relative Kosmopolitenmengen dar, bezogen auf die jeweiligen Kosmopolitenmengen am ersten untersuchten Entwicklungstag: Abb. 6, 8, 10, 12

Tab. 6 Eigelb: Relative Gesamtkonzentrationen der ätherlöslichen DNP-Aminosäuren. - I_F und I_T *

Entwicklungstage	3	6	9	12	15
Eingesetzte Menge (Frischgewicht in gr)	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0
Trockengewicht in % des Nassgewichtes (Tab.4)	44,3	27,3	21,3	34,3	27,8
Effektiv bearbeitete Trockensubstanz in gr	8,85	5,45	4,26	6,86	5,56
Zur Chromatographie benötigter Anteil	6 µl/ml	10 µl/ml	10 µl/ml	20 µl/ml	20µl/ml
I_F *	1,0	0,6	0,6	0,3	0,3
I_T *	1,0	0,97	1,25	0,39	0,48

* Definition im Abschnitt III/3 a

Tab. 7 Eiklar: Relative Gesamtkonzentrationen der ätherlöslichen DNP-Aminosäuren. - I_F und I_T *

Entwicklungstage	3	6	9	12	15
Eingesetzte Menge (Frischgewicht in gr)	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0
Trockengewicht in % des Nassgewichtes (Tab. 4)	15,4	29,1	35,6	35,2	36,3
Effektiv bearbeitete Trockensubstanz in gr	1,54	2,91	3,56	3,52	3,63
Zur Chromatographie benötigter Anteil	50 µl/ml	40 µl/ml	40µl/ml	40µl/ml	40µl/ml
I_F *	1,0	1,25	1,25	1,25	1,25
I_T *	1,0	0,66	0,54	0,55	0,53

* Definition im Abschnitt III/3 a

Tab. 8 Amnion: Relative Gesamtkonzentrationen der ätherlöslichen DNP-Aminosäuren. - I_F und I_T *

Entwicklungstage	6	9	12	15
Eingesetzte Menge (Frischgewicht in gr)	0,7281	2,4506	10,00	5,00
Trockengewicht in % des Nassgewichtes (Tab.4)	0,35	0,77	1,22	15,1
Effektiv bearbeitete Trockensubstanz in gr umgerechnet auf 1 gr Frischgewicht	0,00343	0,0077	0,012	0,151
Zur Chromatographie benötigter Anteil, umgerechnet auf 1 gr Frischgew.	70ul/ml	81,5ul/ml	78,6ul/ml	40ul/ml
I_F *	1,0	0,86	0,89	1,75
I_T *	1,0	0,38	0,256	0,04

* Definition im Abschnitt III/3 a

Tab. 9 Allantois: Relative Gesamtkonzentrationen der ätherlöslichen DNP-Aminosäuren. - I_F und I_T *

Entwicklungstage	6	9	12	15
Eingesetzte Menge (Frischgew. in gr)	1,253	18,007	20,01	4,45
Trockengewicht in % des Nassgewichtes (Tab.4)	0,37	0,87	1,2	1,1
Effektiv bearbeitete Trockensubstanz in gr, umgerechnet auf 1 gr Frischgewicht	0,0037	0,0087	0,0120	0,0110
Zur Chromatographie benötigter Anteil, umgerechnet auf 1 gr Frischgew.	100ul/ml	90ul/ml	200ul/ml	45ul/ml
I_F *	1,0	1,11	0,5	2,22
I_T *	1,0	0,47	0,15	0,75

* Definition im Abschnitt III/3 a

c) Verlauf von I_F und I_T sowie I_{Fkorr} (F, T und F_{korr} -Kurven) Vergleich mit den zeitlichen Veränderungen von Wassergehalt und Trockensubstanz

In den Abbildungen 5, 7, 9 und 11 sind die I_F und I_T Werte nach den Tabellen 6-9 eingetragen. Die Abbildungen 6, 8, 10 und 12 zeigen neben den I_{Fkorr}-Werten den relativen Verlauf des Wasser- und des Trockengehaltes; die betreffenden Zahlen wurden nach den Angaben der nachstehenden Tabelle 10 ermittelt.

Tab. 10 Ermittlung des relativen Wasser- und Trockengehaltes. (absolute Trockengehalte und Frischgewichte laut Tab. 3 und 4)

Eigelb					
Entwicklungstag	3	6	9	12	15
Trockengehalt (TG)	8,22gr	5,92gr	6,80gr	7,07gr	4,43 gr
Relativer TG, bezogen auf den 3.Entwicklungstag	1	0,72	0,83	0,86	0,53
Wassergehalt (WG) (aus Differenz von Frischgewicht und Trockengehalt)	10,34 gr	15,76gr	25,06gr	13,54gr	11,54gr
Relativer WG, bezogen auf den 3. Entwicklungstag	1	1,52	2,43	1,31	1,11
Eiklar					
Trockengehalt (TG)	4,72gr	3,46gr	3,49gr	3,74gr	0,79gr
Relativer TG, bezogen auf den 3.Entwicklungstag	1	0,74	0,74	0,79	0,17
Wassergehalt (WG) (aus Differenz von Frischgewicht)und Trockengehalt)	25,98gr	8,45gr	6,28gr	6,88gr	1,39gr
Relativer WG, bezogen auf den 3. Entw. Tag	1	0,32	0,24	0,27	0,054
Amnion					
Trockengehalt (TG)	1,53mg	11,7mg	45,3mg	428,0 mg	
Relativer TG, bezogen auf den 3. Entwicklungstag	1	7,6	29,6	280,5	
Wassergehalt (WG)(aus Differenz von Frischgewicht und Trockengehalt)	0,509gr	1,508gr	3,664gr	2,412gr	

Fortsetzung zu Tab. 10

Amnion				
Entwicklungstag	6	9	12	15
Relativer WG, bezogen auf den 3. Entwicklungstag	1	3	7,1	4,7

Allantois				
Trockengehalt (TG)	303 mg	15,7 mg	85,0mg	51,6mg
Relativer TG, bezogen auf den 3. Entwicklungstag	1	5,2	27,2	17,0
Wassergehalt (WG) (aus Differenz von Frischgewicht und Trockengehalt)	0,816gr	1,794gr	7,005gr	5,118gr
Relativer WG, bezogen auf den 3. Entwicklungstag	1	2,2	8,6	6,3

Bei Betrachtung der Abbildungen 5-12 läßt sich nun folgendes festzustellen:

Abb. 5 Eigelb: Verlauf der relativen Kosmopoliten Konzentrationen I_F und I_T.

Kurve F: rel. Konzentrationen in Frischsubstanz (I_F Werte)

Kurve T: rel. Konzentrationen in Trockensubstanz (I_T Werte)

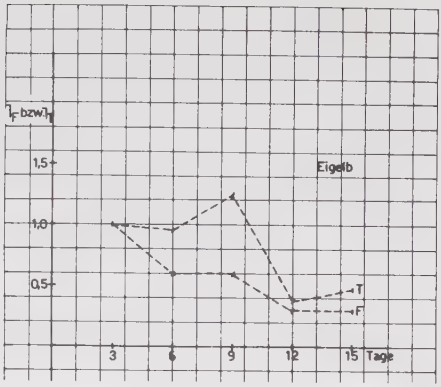


Abb. 6 Eigelb: Verlauf des relativen Trockengewichtes, des relativen Wassergehaltes und der relativen Kosmopoliten-Menge

Kurve TG: rel. Trockengewichte

Kurve WG: rel. Wassergehalt

Kurve F_{korr}: rel. Kosmopoliten Menge

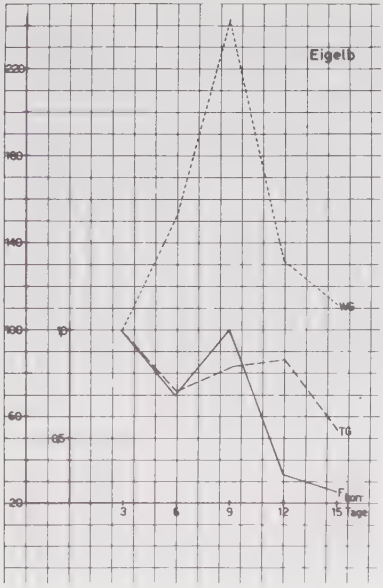


Abb. 7 Eiklar: Verlauf der relativen Kosmopoliten Konzentrationen I_F und I_T.

Kurve F: rel. Konzentrationen in Frischsubstanz (I_F Werte)

Kurve T: rel. Konzentrationen in Trockensubstanz (I_T Werte)

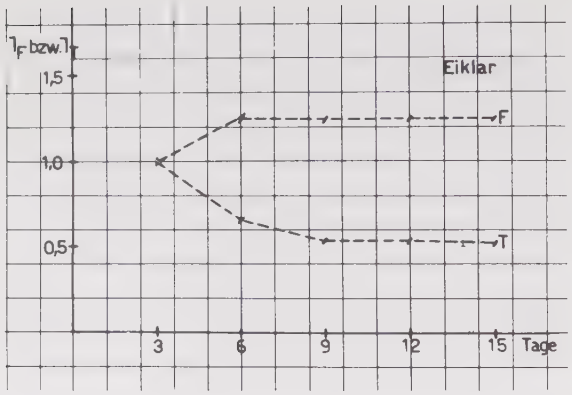


Abb.8 Eiklar: Verlauf des relativen Trockengewichtes, des relativen Wassergehaltes und der relativen Kosmopoliten Menge.

Kurve TG: rel. Trockengewichte

Kurve WG: rel. Wassergehalt

Kurve F_{korr}: rel. Kosmopoliten Menge

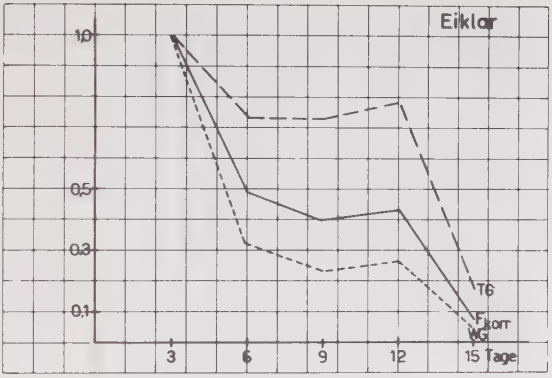


Abb. 9 Amnion: Verlauf der relativen Kosmopoliten Konzentrationen I_F und I_T.

Kurve F: rel. Konzentrationen in Frischsubstanz (I_F Werte)

Kurve T: rel. Konzentrationen in Trockensubstanz (I_T Werte)

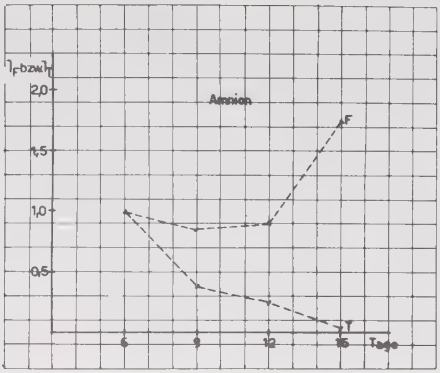


Abb. 10 Amnion: Verlauf des relativen Trockengewichtes, des relativen Wassergehaltes und der relativen Kosmopoliten Menge

Kurve TG: rel. Trockengewichte

Kurve WG: rel. Wassergehalt

Kurve F_{korr}: rel. Kosmopoliten Menge

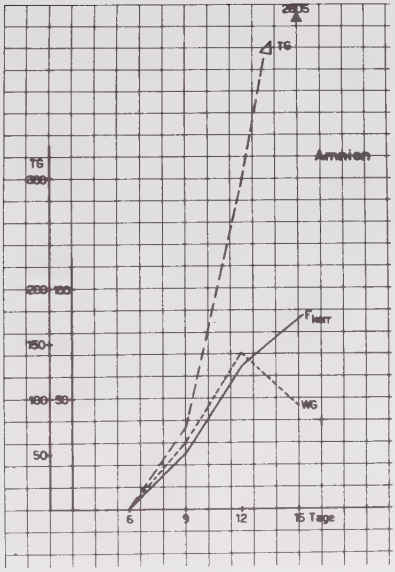


Abb. 11 Allantois:Verlauf der relativen Kosmopoliten Konzentrationen I_F und I_T.

Kurve F: rel. Konzentrationen in Frischsubstanz (I_F Werte)

Kurve T: rel. Konzentrationen in Trockensubstanz (I_T Werte)

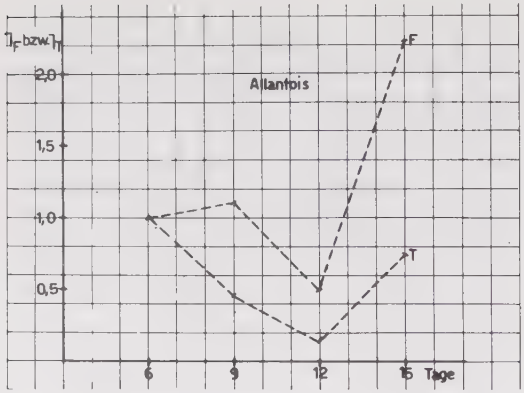
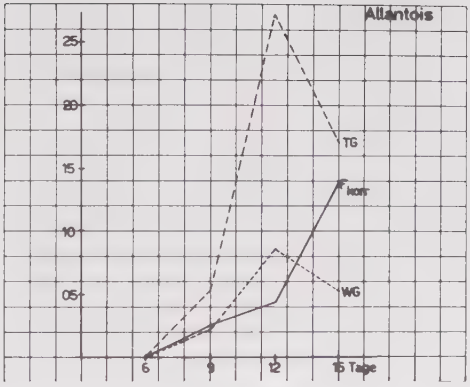


Abb. 12 Allantois: Verlauf des relativen Trockengewichtes , des relativen Wassergehaltes und der relativen Kosmopoliten Menge.

Kurve TG: rel. Trockengewichte

Kurve WG: rel. Wassergehalt

Kurve F_{korr}: rel. Kosmopoliten Menge



Eigelb

3. - 6. Tag: Die Kosmopoliten-Menge fällt, Trockengehalt fällt, Wassergehalt steigt an. Dementsprechend fällt I_F und bleibt I_T nahezu konstant.

6. - 9. Tag: Kosmopoliten-Menge steigt stark an, Trockengehalt steigt schwächer, Wassergehalt steigt stark. Dementsprechend bleibt I_F konstant und wird I_T grösser.

9. -12. Tag: Kosmopoliten-Menge fällt sehr stark, Trockengehalt steigt schwach an, Wassergehalt fällt. Dementsprechend fallen sowohl I_F wie I_T, wobei der Abfall von I_T besonders gross ist.

12.-15. Tag: Kosmopoliten-Menge fällt schwach weiter, Trockengehalt fällt stark, Wassergehalt fällt schwach weiter. Dementsprechend bleibt I_F konstant und steigt I_T schwach an.

Die Gesamtveränderungen bestehen vom 3.-6. Tag in einer Verdünnung, hervorgerufen durch Substanzabnahme und Wasserzunahme, vom 6.-9. Tag in einer Zunahme sowohl des Wasser- als auch des Substanzgehaltes, die zwischen dem 9. und 15. Tag von einer massiven Abnahme gefolgt ist. Bemerkenswert ist, dass die Änderung der Kosmopoliten-Menge zwischen dem 6. und 15. Tag der Anderung im Trockengehalt vorausläuft. (Phasenverschiebung).

Eiklar

3. - 6. Tag: Sowohl Kosmopoliten-Menge und Wassergehalt, als auch Trockengehalt zeigen eine fast parallel verlaufende starke Abnahme. Weil der Wassergehalt stärker abnimmt, steigt I_F an.

Da der Trockengehalt schwächer abnimmt, nimmt I_T ab.

6. - 9. Tag: Weitere etwas langsamere Abnahme an Kosmopoliten-Menge und an Wassergehalt, Trockengehalt bleibt konstant. Infolge paralleler Abnahme von Kosmopoliten-Menge und Wassergehalt zeigt I_F keine Veränderung. Da aber der Trockengehalt konstant bleibt, fällt I_T schwach.

9. -12. Tag: Annähernd parallele Verschiebung aller Substanzmengen mit leichter Zunahme (?), die indessen nicht gesichert ist. Dementsprechend bleiben I_F und I_T konstant.

12.-15. Tag: Steile Abnahme aller Substanzmengen (Kosmopoliten, Trockensubstanz und Wasser), die parallel laufen. Dementsprechend bleiben I_F und I_T weiter konstant.

Die Gesamtveränderungen bestehen in einer ständigen Substanzabnahme, die allerdings zwischen dem 6. und 12. Tag verlangsamt ist und sogar in der zweiten Hälfte dieser Etappe einer vorübergehenden leichten Erhöhung Platz macht.

Amnion

6. - 9. Tag: Kosmopoliten-Menge, Wassergehalt und Trockengehalt steigen, in der erwähnten Reihenfolge wachsend, stark an. Dementsprechend nimmt I_F schwach und I_T stark ab.

9. -12. Tag: Weitere Zunahme, besonders stark beim Trockengehalt. Kosmopoliten-Menge und Wassergehalt nehmen etwa parallel zu. Dementsprechen bleibt I_F nahezu konstant und fällt I_F weiter.

12.-15. Tag: Riesige Zunahme an Trockensubstanz, weitere Zunahme an Kosmopoliten-Menge, Wassergehalt fällt. Dementsprechend steigt I_F an und I_T fällt weiter.

Die Gesamtveränderungen zeigen eine Zunahme bis zum 9. Tag. Diese geht bis zum 12. Tag in gleichem Maße weiter für die Kosmopoliten und den Wassergehalt; der Trockengehalt steigt viel massiver. Diesem Verlauf entspricht eine starke Divergenz der F und T Kurven, die sich vom 12. bis 15. Tag noch weiter verstärkt. Letzteres beruht auf dem Einbruch von Eiweiss aus Eiklar: nochmalige starke Zunahme des Trockengehaltes bei abgeschwächter Steigerung des Aminosäuregehaltes und Abfall des Wassergehaltes. - Der allgemeine Verlauf deutet auf die Anlage eines Substanzdepots, das vom 12. Tage an noch massiv mit bis anhin fehlenden Eiweißstoffen ergänzt wird.

Allantois

6. - 9. Tag: Kosmopoliten-Menge steigt an, Trockengehalt steigt stärker an, Wassergehalt steigt etwa in gleichem Maße wie Kosmopoliten-Menge. Dementsprechend zeigt I_F eine schwache Zunahme und I_T eine Abnahme.

9. -12. Tag: Kosmopoliten-Menge steigt weiter, Trockengehalt steigt sehr stark, Wassergehalt steigt etwas schneller als bisher. Dementsprechend muss I_T, aber auch I_F, sinken.

12.-15. Tag: Kosmopoliten-Menge nimmt sehr stark zu, Trockengehalt nimmt massiv, Wassergehalt weniger massiv ab. Folglich werden I_F und I_T eindeutig grösser.

Die Gesamtveränderungen bis zum 12. Tag entsprechen in ihrer Tendenz etwa jenen im Amnion. Ein krasser Unterschied ergibt sich aber vom 12. Tag an mit dem Verschwinden eines Teils der Trockensubstanz bei gleichzeitigem starken Anstieg der Kosmopoliten. Wir beobachten vom 12. Tag an eine dramatische Änderung in der qualitativen Zusammensetzung der Amnionflüssigkeit.

a. Schätzungen des Aminosäure-Totalgehaltes. Zeitlicher Verlauf innerhalb der Kompartimente (Vergleich mit F_{korr}) und zeitlicher Querschnitt über die Kompartimente.

Aus der DNP-Fleckenintensität auf den Dünnschichtplatten haben wir den Aminosäuregehalt berechnet. Die Rechnung basiert, wie im methodischen Teil erwähnt wurde, auf der Annahme, dass jeder Aminosäurefleck bei optimalen Chromatogrammen durchschnittlich 4 γ DNP-Aminosäure entspricht.
Die Berechnungen sind in den Tabellen 11 und 12 wiedergegeben. Die Umrechnung von DNP-Aminosäuren in Tab. 11 erfolgte unter Benutzung eines durchschnittlichen Umrechnungsfaktors von 0,544, den man erhält, wenn man die Summe der Molgewichte aller untersuchten DNP-Aminosäuren nach Tab. 5, durch die Summe der Molgewichte der betreffenden ätherlöslichen DNP-Aminosäuren dividiert.

Die Aminosäure-Totalgehalte nach Tab. 12 wurden durch Multiplikation der Gehalte nach Tab. 11 mit einem Quotienten Q erhalten, der dem Verhältnis von totalem Frischgewicht zu untersuchtem Frischgewichtsanteil entspricht.

Tab. 11 Abschätzung des Aminosäure-Totalgehaltes in den untersuchten Frischgewichtsanteilen

Eigelb Entwicklungstage	3	6	9	12	15
Zahl der auf der DC-Platte gefundenen AS*	16	20	18	15	15
Menge der AS auf einem optimalen Chromatogramm, wenn jeder Fleck 4γ enthält	64 γ	80 γ	72 γ	60 γ	60 γ
Aufgetragener Anteil der Aceton-Lösung	0,6%	1,0%	1,0%	2,0%	2,0%
Gesamtmenge DNP-AS in Aceton-Lösung	10,67mg	8,0mg	7,2mg	3,0mg	3,0mg
Gesamtmenge AS in Frischgewichtsanteil	3,67mg	2,76mg	2,48mg	1,03mg	1,03mg
Eiklar					
Zahl der auf der DC-Platte gefundenen AS*	14	15	15	15	14
Menge der AS auf einem optimalen Chromatogramm, wenn jeder Fleck 4γ enthält	56 γ	60 γ	60 γ	60 γ	56 γ
Aufgetragener Anteil der Aceton-Lösung	5,0%	4,0%	4,0%	4,0%	4,0%
Gesamtmenge DNP-AS in Aceton-Lösung	1,12mg	1,5mg	1,5mg	1,5mg	1,4mg
Gesamtmenge AS in Frischgewichtsanteil	0,385mg	0,516mg	0,516mg	0,516mg	0,382mg

* In ihrem gemeinsamen Fleck auf der DC-Platte sind Di-DNP-Lysin und Di-DNP-Tyrosin getrennt gezählt worden.

Fortsetzung Tabelle 11

Amnion Entwicklungstage	6	9	12	15
Zahl der auf der DC-Platte gefundenen AS*	5	11	12	14
Menge der AS auf einem optimalen Chromatogramm, wenn jeder Fleck 4γ enthält	20 γ	44 γ	48 γ	56 γ
Aufgetragener Anteil der Aceton-Lösung	5,0%	2,0%	0,8%	2,0%
Gesamtmenge DNP-AS in Aceton-Lösung	0,25 mg	2,2mg	6,0mg	2,8 mg
Gesamtmenge AS in der Aceton-Lösung	0,086 mg	0,756mg	2,06mg	0,96 mg
Allantois				
Zahl der auf der DC-Platte gefundenen AS *	14	17	17	20
Menge der AS auf einem optimalen Chromatogramm, wenn jeder Fleck 4γ enthält	56 γ	68 γ	68 γ	80 γ
Aufgetragener Anteil der Aceton-Lösung	8,0%	0,5%	1,0%	1,0%
Gesamtmenge DNP-AS in Aceton-Lösung	0,7mg	13,6mg	6,8mg	8,0mg
Gesamtmenge AS in Frischgewichtanteil	0,241mg	4,7mg	2,34 mg	2,75 mg

* In ihrem gemeinsamen Fleck auf der DC-Platte sind Di-DNP-Lysin und Di-DNP-Tyrosin getrennt gezählt worden.

Tab. 12 Trockensubstanzgehalt und Abschätzung des Aminosäuregehaltes von Eigelb, Eiklar, Amnion und Allatois während der Hühnerembryogenese pro Ei gerechnet.

	Eigelb			Eiklar		
Entwicklungstage	Q	AS	TG	Q	AS	TG
3 tägig	0,937	3,41mg	8,22gr	30,7	1,19mg	4,12gr
6 tägig	1,08	2,98mg	5,92gr	1,19	0,62mg	3,46gr
9 tägig	1,59	3,96mg	6,80gr	0,97	0,50mg	3,49gr
12 tägig	1,06	1,05mg	7,07gr	1,06	0,55mg	3,74gr
15 tägig	0,80	0,83mg	4,43gr	0,218	0,83mg	0,79gr
	Amnion			Allantois		
6 tägig	0,70	60 γ	1,53mg	0,656	158 γ	3,03mg
9 tägig	0,64	470 γ	11,7mg	0,100	470 γ	15,7mg
12 tägig	0,371	765 γ	45,3mg	0,355	830 γ	85,0mg
15 tägig	0,568	546 γ	428,0mg	1,17	3210 γ	51,6mg

Der zeitliche Verlauf des Aminosäuregehaltes innernalb der Kompartimente ergibt sich am besten, wenn man die in Tabelle 13 dargestellten, auf das jeweilige erste Entwicklungsstadium bezogenen, relativen Werte betrachtet, die wir mit dem Symbol AS_{rel} bezeichnen. Zum Vergleich mit den F_{korr}-Werten, welche, wie erinnerlich auf das jeweilige erste Entwicklungsstadium bezogene, relative Kosmopoliten-Mengen angeben, sind diese in Tab. 13 den Zahlen für AS_{rel} gegenübergestellt. - Auf eine graphische Darstellung wird verzichtet, weil wir dem Vergleich aus den früher erwähnten Gründen kein allzu grosses Gewicht beimessen wollen.

Tab. 13 Zeitlicher Verlauf des relativen Aminosäure-Totalgehaltes AS_{rel} und Vergleich mit dem zeitlichen Verlauf der relativen Kosmopoliten-Menge F_{korr}

Entwicklungstag	Eigelb		Eiklar		Amnion		Allantois	
	AS_{rel}	F_{korr}	AS_{rel}	F_{korr}	AS_{rel}	F_{korr}	AS_{rel}	F_{korr}
3. Tag	1,0	1,0	1,0	1,0	-	-	-	-
6. Tag	0,87	0,70	0,52	0,49	1,0	1,0	1,0	1,0
9. Tag	1,15	1,0	0,42	0,40	7,8	2,56	2,97	2,44
12.Tag	0,51	0,53	0,46	0,44	12,7	6,47	5,25	4,50
15.Tag	0,25	0,25	0,66	0,08	9,1	8,75	20,3	13,98

Einen Querschnitt über die Situation in allen Kompartimenten zu einem gegebenen Zeitpunkt erhält man z.B., wenn man die Aminosäure-Gehalte bzw. Trockengehalte von Eiklar, Amnion und Allantois auf jene von Eigelb bezieht (Tab.14, Abb. 13 und 14)

Tab. 14 Zeitlicher Querschnitt über die Kompartimente, gemessen an dem auf Eigelb bezogenen 'reduzierten' Aminosäure-Gehalt AS_{red} und Trockengehalt TG red

Entwicklungstag	Eigelb		Eiklar		Amnion		Allantois	
	AS_{red}	TG_{red}	AS_{red}	TG_{red}	AS_{red}	TG_{red}	AS_{red}	TG_{red}
3. Tag	1,0	1,0	0,550	0,574	-	-	-	-
6. Tag	1,0	1,0	0,21	0,84	0,020	0,0002	0,053	0,00051
9. Tag	1,0	1,0	0,129	0,51	0,119	0,0017	0,116	0,0023
12.Tag	1,0	1,0	0,52	0,53	0,123	0,0064	0,78	0,012
15.Tag	1,0	1,0	1,0	0,18	0,66	0,97	3,87	0,012

Abb. 13
Zeitlicher Querschnitt über die Kompartimente, gemessen an dem auf Eigelb bezogenen reduzierten Trockengehalt TG_{red}.

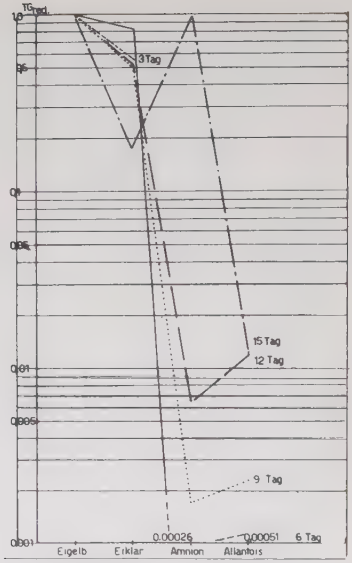
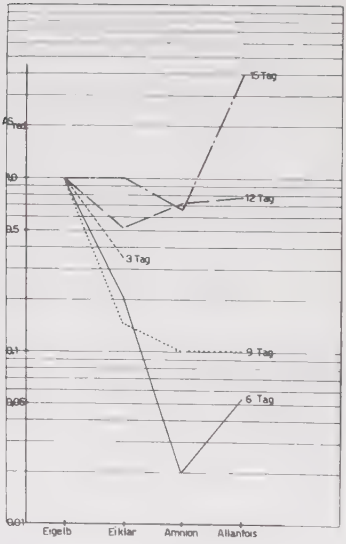


Abb. 14
Zeitlicher Querschnitt über die Kompartimente, gemessen an dem auf Eigelb bezogenen reduzierten Aminosäuregehalt AS_{red}.



Ordinate: auf Eigelb bezogene, reduzierte Gehaltsänderungen (logaritmischen Maßstab beachten!)
Abszisse: Eikompartimente an bestimmten Entwicklungstagen.

Bei Betrachtung der Tab. 13 und die dazugehörenden beiden Abb. 13 und 14 muß vorausgeschickt werden, daß wir hier keine Bilanz über das an einem bestimmten Entwicklungstag sich abspielende Geschehen geben können, weil der Embryo, als größter Konsument, in unsere Untersuchungen nicht einbezogen wurde. So vermittelt der mitgeteilte zeitliche Querschnitt über die von uns untersuchten vier extraembryonalen Eikompartimente nur einen Eindruck, wie sich in einem bestimmten Entwicklungsstadium die relativen Trockengehalte und relativen Aminosäuregehalte von Eiklar, Amnion und Allantois zum Eigelb als Vergleichbasis verhalten.

3. Tag: Eiklar enthält weniger Trockensubstanz und Aminosäure als Eigelb.

6. Tag: Am meisten Trockensubstanz und Aminosäuren enthält Eigelb, gefolgt von Eiklar. Amnion hat am wenigsten Trockensubstanz und Aminosäuren; Allantois etwas mehr. Zwischen Eigelb und Eiklar einerseits und Amnion und Allantois andererseits besteht ein Riesenunterschied, besonders an Trockengehalt, der etwa einem Faktor 10^3 entspricht.

9. Tag: Trockensubstanzgehalt und Aminosäuregehalt zeigen etwa das gleiche Bild wie am 6. Tag, - wobei sich allerdings der Unterschied an Trockengehalt von Eigelb und Eiklar einerseits und Amnion und Allantois andererseits verringert. Der Aminosäuregehalt von Amnion und Allantois erreicht fast denjenigen von Eiklar.

12. Tag: Der Trockensubstanzgehalt wächst weiter; das Bild von dem 9. Tag verschiebt sich parallel. Der Aminosäuregehalt von Amnion und Allantois wird größer als derjenige von Eiklar.

15. Tag: Amnion und Eigelb enthalten etwa die gleiche Menge Trockensubstanz, womit die ernährungsphysiologische Rolle des Amnions zum Ausdruck kommt. Wegen des Eiweißabtransportes vom Eiklar ins Amnion fällt der Trockengehalt von Eiklar stark unter denjenigen von Eigelb und Amnion. Die Allantois enthält immer noch am wenigsten Trockensubstanz. Der Aminosäuregehalt der Allantois macht dagegen einen großen Sprung und wird größer als diejenige von Eigelb und Eiklar, die etwa das gleiche Niveau haben. Die kleinste Aminosäuremenge enthält Amnion.

Das allgemeine Bild zeigt eine fortschreitende Verminderung des Substanzgefälles zwischen Eiklar, Amnion und Allantois einerseits und dem Eigelb andererseits; daraus darf man aber nicht schließen, daß dieser Ausgleich auf Kosten des Eigelbes erfolge, denn in unserer Bilanz fehlt ja der Embryo. Diese Ausgleich-Tendenz wird gegen den 12. Entwicklungstag dadurch gestört, daß einerseits vom Eiklar ins Amnion eine große Eiweißwanderung stattfindet, und andererseits dadurch,daß ungefähr vom selben Zeitpunkt an ein massiver Anstieg des Aminosäuregehaltes in der Allantois erfolgt.

4. Vergleich der dünnschichtchromatographischen semiquantitativen Analyse von Eiklar mit den säulenchromatographischen quantitativen Analyse nach Stein und Moore

Diese Analyse diente vor allem zur Bestätigung der+oben erörterten, auf einem semiquantitativen Weg gewonnenen Ergebnisse.

Es wurde eine Probe von einem 12-tägigen Eiklarmaterial-Pool nach Stein und Moore analysiert. Die uns vom Kinderspital Basel gelieferten analytischen Resultate unterstützen unsere semiquantitativen Aussagen. (Vgl. Abb.15 und16 und Tab. 15).

Von den Angaben fehlt Arginin in der Gruppe der basischen Aminosäuren. Weil es auch unter den ätherlöslichen DNP-Aminosäuren nicht vorkommt, können wir über das Verhalten dieser Aminosäure in den extraembryonalen Flüssigkeiten während der Embryogenese keinerlei Auskunft geben.

Wir haben auf der Dünnschichtplatte vom Eiklar am 12. Entwicklungstag 14, oder wenn wir die gemeinsam auftretenden DNP-Aminosäureflecken Tyrosin-Lysin und Isoleucin-Leucin getrennt zählen, insgesamt 16 verschiedene freie Aminosäuren nachgewiesen. (S. Abbld. 16). Mit der Analyse nach Stein und Moore waren an diesem Entwicklungstag im Eiklar 17 verschiedene freie Aminosäuren nachweisbar. Davon wurde Glutamin, das auf der Kurve nur als eine Schulter von Serin erschien (S. Abb. 15) fast übersehen und nur auf Grund der dünnschichtchromatographischen

Befunde, bei denen es eindeutig auftrat, entdeckt. Methionin, das etwa in gleicher Menge wie Glutamin (0,034 mg und 0,036 mg) nach den analytischen Resultaten nach Stein und Moore vorhanden war, konnten wir dünnschichtchromatographisch nicht nachweisen. Abgesehen von den spurenmäßig vorhandenen Aminosäuren (Ornithin und Tryptophan bei der Dünnschichtchromatographie, -ß-Alanin und Cystin bei der Analyse nach Stein und Moore) sind die vorhandenen Aminosäuren qualitativ und auch ungefähr mengenmäßig identisch. Die Verschiedenheiten der Resultate bezüglich Methionin und in den nur spurenweise vorkommenden Aminosäuren sind vielleicht nur auf individuelle Schwankungen des Analysematerials zurückzuführen.

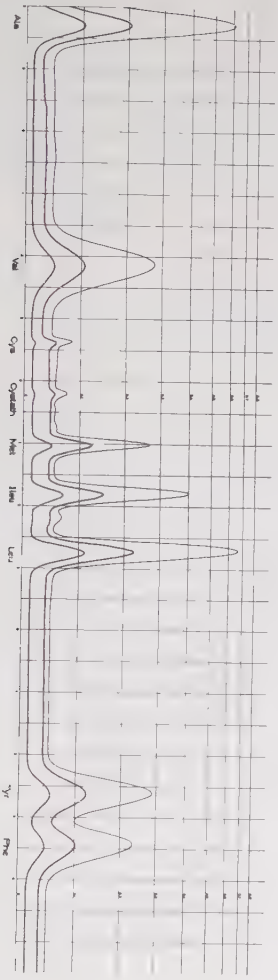
Von der Aminosäure Histidin, die in dinitrophenylierter Form nur zum Teil in die ätherlösliche Fraktion geht und deshalb bei der dünnschichtchromatographischen Analyse nie in ihrer Gesamtmenge vertreten war, hat die Analyse ergeben, daß sie in relativ großer Menge vorkommt.

Man kann schließlich feststellen, daß die pro Eiklar am 12. Entwicklungstage gefundene Menge von 1,991 mg freie Aminosäure mit dem auf der Dünnschichtplatte erzielten Resultat ungefähr übereinstimmt. Dort haben wir auf semiquantitativem Weg 0,55 mg freie Aminosäuren ermittelt.

Die größenordnungsmäßig gute Übereinstimmung der beiden Resultate spricht für die Zulässigkeit unserer dünnschichtchromato-

graphischen Arbeitsweise.

Abb. 15. Säulenchromatographische Analyse der Aminosäuren von Eiklar an dem 12. Entwicklungstag der Hühnerembryogenese.
A) Säure- und neutrale Bestandteile:



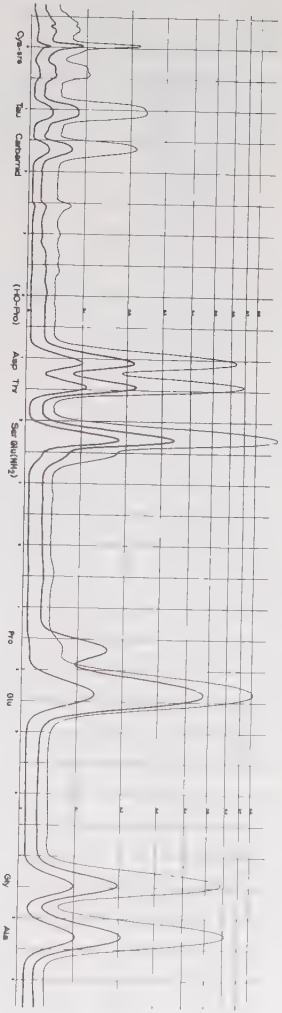
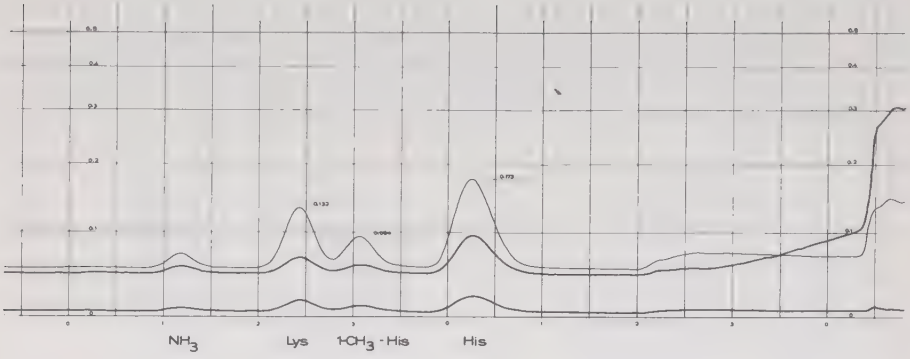


Abb. 15

B) Basische Bestandteile:



Ordinate: Extinktion (logaritmischen Maßstab beachten!)

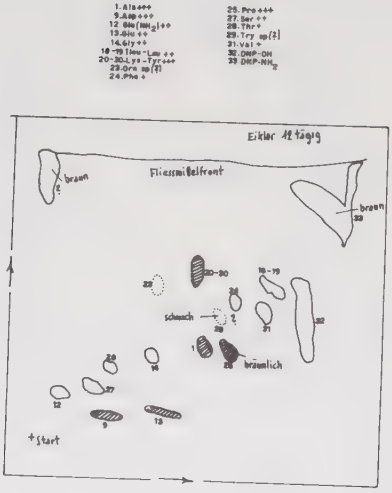
Abszisse: Eluatvolumen

Die drei übereinanderstehenden Kurven entsprechen von oben nach unten der Extinktion bei 570 mμ (relative Schichtdicke 1), - der Extinktion bei 440 mu (relative Schichtdicke 1), - der Extinktion bei 570 mμ (relative Schichtdicke 10). Bei der Farbmessung handelt es sich um die Auswertung der Ninhydrin Reaktion; der resultierende Farbstoff adsorbiert bei 570 mμ bzw. (im Falle von Prolin und Hydroxyprolin) bei 440 mμ.

Tab. 15 Menge der einzelnen Aminosäuren im Eiklar eines Hühnereies am 12. Tage der Embryogenese, auf Grund der säulenchromatographischen Analyse nach Stein und Moore.

Aminosäuren	Mol pro Ei	gefundene Menge in mg pro Ei
Asparaginsäure	1,02	0,133
Threonin	0,86	0,102
Serin	1,23	0,129
Asparagin	-	-
Glutamin	0,27	0,034
Prolin	1,26	0,145
Glutaminsäure	2,28	0,336
Glycin	1,17	0,138
Alanin	1,33	0,118
Valin	0,86	0,100
1/2 Cystin	?	?
Methionin	0,24	0,036
Isoleucin	0,47	0,062
Leucin	0,98	0,128
Tyrosin	0,70	0,126
Phenylalanin	0,54	0,139
ß-Alnin	ev. Spuren	ev. Spuren
Lysin	0,48	0,069
1-Ch_3-Histidin	0,26	0,045
Histidin	0,98	0,151
Arginin	wurde nicht bestimmt	-
Gesamtmenge der gefundenen Aminosäuren pro Ei		1,991 mg

Abb. 16 Dünnschichtchromatogramm der DNP-Aminosäuren vom Eiklar am 12. Entwicklungstag der Hühnerembryogenese. (Vgl. Abb. 15)



5. Addendum:

a) Die freien Aminosäuren der Blutflüssigkeit am 10. Entwicklungstag

Wir haben eine Blutentnahme bei 10-tägigen Hühnerembryonen vorgenommen. Weitere Untersuchungen sind aber aus den im methodischen Teil erörterten Gründen nicht mehr ausgeführt worden. Es gelang uns, 1,83 gr Blutflüssigkeit zu gewinnen. Nach erfolgter Dinitrophenylierung haben wir die DNP-Aminosäuren in 0,1 ml Aceton gelöst und 8 µl davon chromatographiert. Wir haben die Aminosäuren je nach Fleckenintensiät in drei Gruppen eingeteilt und die Resultate in Tab. 16 zusammengestellt.

Tab. 16 Freie Aminosäuren in der Blutflüssigkeit von 10 tägigen Hühnerembryonen.

Größere Mengen	Mittlere Mengen	Kleinere Mengen
Ala	Gly	ß-Ala
Asp	Phe	Abut (?)
Glu (NH_2)	Pro	Asp (NH_2) (?)
Ileu-Leu	Thr	Hylys
Lys-Tyr	Try	Hypro
Glu	+ 1 Unbekannte	Orn
Ser		Sark
Val		+ 3 Unbekannte

Im Hinblick auf die von Giacomini aufgestellte Hypothese über die Entstehung der Amnionflüssigkeit, haben wir von den gleichen Embryonen 2,74 gr Amnionflüssigkeit gewonnen, um nach erfolgter

Dinitrophenylierung die DNP-Aminosäuren mit denjenigen der Blutflüssigkeit vergleichen zu können. Das Ergebnis, die freie Aminosäuren in der Amnionflüssigkeit von 10 tägigen Hühnerembryonen sind in Tab. 17 zusammengefaßt.

Tab. 17 Freie Aminosäuren in der Amnionflüssigkeit von 10-tägigen Hühnerembryonen

Größere Mengen	Mittlere Mengen	Kleinere Mengen
Ala	Ileu-Leu	Pro
Glu (NH_2)	Phe	
Gly	Val	
Lys-Tyr		
Ser		
Thr		

Wenn wir die Tabellen 16 und 17 miteinander vergleichen und berücksichtigen, daß wir 1,5-mal mehr Amnionflüssigkeit als Blutflüssigkeit analysiert haben, sofort ersichtlich, daß am 10. Entwicklungstag die Blutflüssigkeit zahlen- und konzentrationsmäßig viel reicher an freien Aminosäuren ist als die Amnionflüssigkeit. Nach unseren Schätzungen ist die Aminosäurekonzentration in der Blutflüssigkeit 4-5 mal größer als in der Amnionflüssigkeit. - Diese Tatsache steht anscheinend im Widerspruch mit der Hypothese, wonach die Amnionflüssigkeit einfach ein Transsudat des sich entwickelnden Vascularsystems der Area pellucida sein soll.

b) Die freien Aminosäuren im Eiklar von unbebrüteten Eiern, sowie von unbefruchteten Eiern während einer sterilen Brutzeit von 0-10 Tagen

Wie schon aus den vorangehenden Resultaten ersichtlich ist, konnten wir zu der Kontroverse, die zwischen anglosächsischen und russischen Forschern in Bezug auf den freien Aminosäuregehalt des Eiklares aufgekommen ist, den eindeutigen Beweis zugunsten der Russen erbringen. Das Eiklar enthält freie Aminosäuren. - In diesem Zusammenhang haben wir unsere Ermittlungen erweitert, und das Eiklar auch von unbebrüteten sowie von unbefruchteten Eiern untersucht.

Im Eiklar von unbebrüteten Eiern fanden wir, neben den zwei Monoaminodicarbonsäuren (Asp. und Glu), die bereits von den Russen nachgewiesen wurden, noch etwa 8 weitere Aminosäuren. Unsere Resultate, die in der Tabelle 18 zusammengestellt sind, stammen von zwei Versuchen. Eine parallel ausgeführte Blindprobe mit Wasser fiel negativ aus. - Aus der Intensität der auf der Dünnschichtplatte identifizierten einzelnen DNP-Aminosäure-Flecken, die wir im Mittel auf etwa 0,5γ schätzten, ergab sich für den Fall, daß 10 verschiedene Aminosäuren nachgewiesen wurden, daß der freie Aminosäuregehalt des Eiklares in unbefruchteten, unbebrüteten Eiern etwa 1,8 mg% ist. Die Umrechnung erfolgte in der Annahme, daß das Eiklar in diesem Stadium 14 % Trockensubstanz enthält (Siehe Tab. 4).

Tab. 18 Freie Aminosäuren im Eiklar von befruchteten, unbebrüteten Eiern.

Ala	Leu-Ileu	Ser
Asp	Lys-Tyr **	Thr
Glu	Phe	Val *
Gly	Pro	und 1 oder 2 nicht identifizierbare Flecken

** Intensivster Fleck, wahrscheinlich überwiegend Lys
* Nur sichtbar, wenn für die Analyse eine größere Menge Substanz aufgetragen wird.

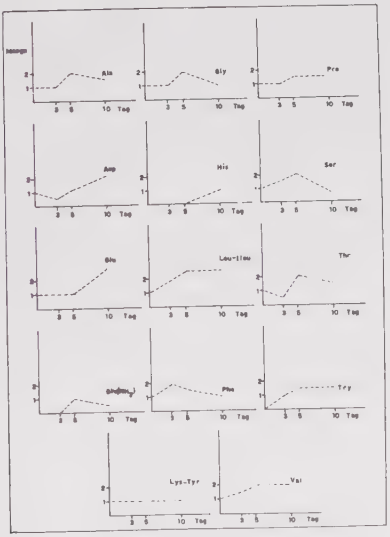
Wie die Verhältnisse im Eiklar von unbefruchteten Eiern während der darauffolgenden sterilen Brutzeit liegen, wurde in weiteren Untersuchungen ermittelt. Die Veränderungen des freien Aminosäuregehaltes des Eiklares von unbefruchteten Eieren wurden während einer sterilen Brutzeit in einem Zeitintervall von 0 - 10 Tagen verfolgt. Die Resultate sind in der Abbildung 17 graphisch dargestellt.

Wie man aus dem Ablauf der Kurven der einzelnen Aminosäuren sieht, zeigt der gesamte Aminosäuregehalt des Eiklares während der sterilen Bebrütung eine Zunahme. - Einige Aminosäuren nehmen allerdings ab, nämlich Alanin, Glutamin, Glycin Phenylalanin und Serin. Verantwortlich für die Veränderungen sind vermutlich desorganisierende Faktoren (Diffusionsvorgänge, unkontrollierte

enzymatische Reaktionen). Das Auftreten von Histidin z.B. im Eiklar von unbefruchteten und sein Fehlen in befruchteten Eiern nach einer entsprechenden Inkubationszeit scheint eine Manifestation dafür zu sein, dafür zu sein, daß die Vorgänge nicht im gleichen Sinne ablaufen.

Abb. 17 Freie Aminosäuren aus Eiklar von unbefruchteten Eiern während einer Inkubationszeit von 0-10 Tagen.

(Die Einheiten sind willkürlich und auf Grund der Fleckenintensität bestimmt worden, - sie drücken eine Tendenz für die Zu-, bzw. Abnahme der einzelnen Aminosäuren aus).



IV. Diskussion

1. Bemerkungen zur Methodik

In der vorliegenden Arbeit haben wir nur die ätherlöslichen DNP-Aminosäuren untersucht. Arginin, Citrullin, Cysteinsäure und Taurin, die bei der Dinitrophenylierung wasserlösliche Derivate bilden, sind in unsere Ermittlungen nicht einbezogen worden. Histidin, das sowohl in der ätherischen als auch in der wässerigen Phase auftritt, haben wir infolgedessen nur zum Teil erfaßt.

Abgesehen von diesen Einschränkungen können wir unsere Methode als empfindlich bezeichnen. Eine von einer amerikanischen Forschergruppe veröffentlichte Arbeit soll als Argument dafür hier erwähnt werden (42). Diese, als einzige Arbeit, die wir auf diesem Gebiet gefunden haben, beschäftigt sich mit der Untersuchung der Aminosäuregehaltsveränderungen während der Hühnerentwicklung, wobei von den extraembryonalen Flüssigkeiten nur das Eigelb untersucht wurde. Die Resultate dieser Gruppe stammen von einer Analyse nach Stein und Moore. Da sie zahlenmäßig über bedeutend weniger Aminosäure im Eigelb berichten als wir sie nachgewiesen haben, und zwar am 6. Entwicklungstag nur 7 anstatt 15 und am 12. Entwicklungstag nur 11 anstatt 14, dürfen wir also auf unsere feinere Arbeitstechnik hinweisen. Man darf allerdings nicht vergessen, daß der Analysengang nach Stein und Moore seit 1954, im Jahre in dem die oben genannte Arbeit gedruckt wurde, ebenfalls durch viele Modifikationen verfeinert

wurde (37).

Unsere zur Selbstkontrolle parallel ausgeführte Analyse nach Stein und Moore liefert ein zusätzliches Argument für die Empfindlichkeit der dünnschichtchromatographischen Dinitrophenylierungsmethodik. - Wir deuten nur kurz wieder auf die bei den Ergebnissen erörterte Tatsache hin, wonach wir das Glutamin nur auf Grund der dünnschichtchromatographischen Indentifizierung ermitteln konnten. Auf der Registrierkurve nach Stein und Moore war diese Aminosäure nur als schwache Schulter des Serin-Peaks zu sehen, die man ohne den dünnschichtchromatographischen Test übersehen hätte.

Die in der zitierten amerikanischen Arbeit untersuchten Tendenzen der Aminosäuregehaltsveränderungen im Eigelb kommen im allgemeinen auch in unseren Ergebnissen zum Ausdruck: eine steigende Produktion freier Aminosäuren (allerdings mit einem vorübergehenden Herabfallen etwa um den 6. Entwicklungstag) bis etwa zum 10. Tag mit deren darauffolgendem schnellen Verbrauch gegen den 12. Tag. Das weitere Geschehen wird von uns bis zum 15. Tag verfolgt und ergänzt: während dieser Zeit werden die freien Aminosäuren weiterhin allmählich verbraucht.

Eine polnische Arbeit (15) untersucht papierchromatographisch die Aminosäuren der Allantoisflüssigkeit. Diese Arbeit beschränkt sich auf 11-tägige Embryone. Es sind hier 16 ver-

schiedene Flecken nachgewiesen worden. Zahlenmäßig stimmt dieses Resultat mit unserem Resultate am 12. Entwicklungstag überein. In der Flecken-Zuordnung zeigen sich aber einige Abweichungen. Auffallend ist, daß die Monoaminodicarbonsäuren und Cystein sowie Cystin, die von uns erst am 15. Tag in kleineren Mengen nachgewiesen werden konnten, hier schon in dieser früheren Entwicklungsphase erfaßbar waren. Ornithin und Hydroxyprolin dagegen, welche Aminosäuren für die Allantoisflüssigkeit bei unseren Untersuchungen fast wie ein Index immer charakteristisch auftraten, fehlen in dieser Aufzählung.

Wir haben uns bemüht, der dünnschichtchromatographischen Dinitrophenylierungsmethode, nach Möglichkeit auch einen quantitativen Sinn zu geben. Dies ist uns semiquantitativ gelungen. Auf diese Weise haben wir Daten ermittelt, die uns durch die Aminosäuren wenigstens größenordnungsgemäß einen Einblick in das embryonale Geschehen erlauben. - Das Bild, das wir geschildert haben, setzt natürlich voraus, daß wir bei der Dinitrophenylierung die Gesamtmenge der freien Aminosäuren in den einzelnen Eikompartimenten jedesmal restlos erfaßt haben. - Die stichprobenartige Kontrollanalyse nach Stein und Moore bei einer Probe von 13-tägigem Eiklarmaterial unterstützt unsere semiquantitativen Aussagen.

1964 ist eine Arbeit im "Journal of Chromatographie" erschienen, die über die quantitativen Auswertungsmöglichkeiten der Amino-

säuren auf dünnschichtchromatographischem Weg mit Hilfe des Spektrophotometers berichtet (9). Diese Mitteilung bringt die Notwendigkeit zum Ausdruck, die wir auch immer wieder während der Ausführung dieser Arbeit gespürt haben, eine Methodik zu finden, die uns erlauben würde, die Aminosäuren auf der Platte auch quantitativ auszuwerten. - Dieser bemerkenswerte Versuch hat aber leider eher theoretische als praktische Bedeutung. Wie berichtet wird, werden die Aminosäuren eindimensional, allerdings nicht mit der Dinitrophenylierungsmethode, quantitativ mit einem 5%igen Fehler erfaßt. Die eindimensionale Auftrennung der Aminosäuren aus biologischem Material scheint vorläufig in der Praxis nicht ausführbar zu sein. Dies gilt umso mehr, als die Resultate dieser Arbeit zum Teil von Kunstprodukten (Norleucin, Norvalin) sprechen und über die so wichtigen Aminosäuren wie Prolin, Hydroxyprolin, Histidin etc., die bekanntlich eine abweichende Farbreaktion geben, keine Auskunft erteilen.

Nach dem oben Gesagten können wir feststellen, daß wir mit Hilfe unserer Methodik einen schnellen und eleganten Weg gefunden haben, um neben qualitativ möglichst vollständigen Aussagen auch unserer Absicht zu entsprechen: die Gehaltsänderungen an freien Aminosäuren in der extraembryonalen Flüssigkeit während der Hühnerembryogenese - wenn auch nur semiquantitativ - abzumessen.

2. Bemerkungen zu den Resultaten

a) Zur Frage der Diffusion zwischen den extraembryonalen Eikompartimenten

Diese Frage stellt sich im Zusammenhang mit der anderen nach der Herkunft der aufgefundenen Inhaltsstoffe bzw. Aminosäuren. Ist z.B. eine gegebene Aminosäure in der Allantoisflüssigkeit ausschließlich Exkretionsprodukt, oder ist sie teilweise - eventuell sogar ganz - eingewandert, z.B. aus dem Eiklar? - Prinzipiell muß man mit der Möglichkeit einer Einwanderung durch Diffusion rechnen. * Die Tatsache jedoch, daß z.B. Ornithin während der ganzen geprüften Inkubationszeit im wesentlichen nur in der Allantois gefunden werden konnte, spricht eher gegen die Möglichkeit einer Diffusion. Diffusionsvorgänge durch eine Membran verlaufen in beiden Richtungen; es hätte also die Allantois in ihre Nachbarkompartimente Ornithin abgeben müssen.

Ebenfalls spricht der Befund über den unterschiedlichen Verlauf der Aminosäuregehaltsänderungen im Eiklar von befruchteten und unbefruchteten Eiern gegen das Vorliegen von Diffusionsvorgängen. (Vgl. Abschnitt III/5 b).

b) Die wahrscheinliche Herkunft der Aminosäuren im Eiklar

Der Nachweis der freien Aminosäuren im Eiklar wirft die Frage über ihre Herkunft auf. - Wir sind geneigt anzunehmen, daß das Eiklar schon im Moment der Eiablage freie Aminosäuren enthält

---

* In einer 1964 erschienenen Arbeit beschäftigt sich C.G. Winter und H.N. Christensen mit den Wanderungen der freien Aminosäuren durch Membrane der menschlichen Erythrocyten (43).

und sie - wie wir es oben erörtert haben, - nicht auf dem Diffusionswege dorthin gelangen. Auch eine Möglichkeit, wonach die Aminosäuren erst bei der Befruchtung zusammen mit der Samenflüssigkeit ins Eiklar eindringen könnten, muß ja wegen des Vorkommens der freien Aminosäuren im Eiklar von unbefruchteten Eiern als ausgeschlossen gelten.

c) Herkunft der Amnionflüssigkeit; Widerlegung der Hypothese von Giacomini

Nach der auch von A.L. Romanoff vertretenen Transsudat-Hypothese (Giacomini 1930) sollte die freie Aminosäurezusammensetzung in Amnion- und Blutflüssigkeit - sofern die Permeabilitätsverhältnisse für alle Aminosäuren annähernd gleich sind - identisch sein. Das ist aber nicht der Fall. Bei der Blutflüssigkeit (S. Tab. 16) konnten wir 24 Flecken auftrennen, wovon 20 indentifiziert wurden: bei der Amnionflüssigkeit hingegen (S. Tab. 17) waren in der gleichen Entwicklungsetappe insgesamt 10 Flecken sichtbar; - es fehlten von den in größeren und mittleren Mengen auftretenden Aminosäuren: Asparaginsäure, Glutaminsäure und Tryptophan, von den in kleineren Mengen bzw. in Spuren vorhandenen Aminosäuren: ß-Alanin, γ- Aminobuttersäure, Asparagin, Hydroxylysin, Hydroxyprolin, Ornithin und Sarkosin. Von den oben genannten Aminosäuren kommt ß-Alanin nur in der Allantois am 9. und 15. Entwicklungstag vor. Ornithin scheint ebenfalls eine vor allem für die Allantois typische Aminosäure zu sein, obwohl es auch während der Embryogenese im Eiklar und

Eigelb zeitweise erscheint. Es fehlt aber immer im Amnion. Hydroxylysin konnten wir sonst auch nur in der Allantois am 15. Entwicklungstag nachweisen (S. Tab. 5), γ-Aminobuttersäure und Sarkosin scheinen hingegen nur in der Blutflüssigkeit vorzukommen.

Bei der Deutung dieser Resultate ist immerhin Vorsicht geboten, weil die methodisch-technischen Schwierigkeiten bei der Blutentnahme eine Beimischungsmöglichkeit interstitieller Flüssigkeit nicht ausschließen. Wenn wir aber das Blut in gewissem Sinne als einen Teil der Interzellularflüssigkeit auffassen, die in die Wände der Blutgefäße eingeschlossen wurde - und dafür spricht z.B. vor allem die gleiche Salzzusammensetzung der beiden Flüssigkeiten, - dann ist diese Einschränkung wegen der Beimischungsgefahr nicht berechtigt. Wir müssen also die Verschiedenheiten der Aminosäurezusammensetzung des Blutes und der Amnions als eine Realität annehmen, wodurch sich die Hypothese von Giacomini nicht bestätigen läßt.

Es scheint uns, daß bei der Entstehung der Amnionflüssigkeit _ die allem Anschein nach extraembryonal geschehen muß - viel eher die mächtigen Wasserwanderungen im extraembryonalen Raum, vor allem der große Wasserverlust im Eiklarkompartiment, wenigstens mitverantwortlich sind.

Die von A.L. Romanoff nach Giacomini abgeleitete Ansicht, die Amnionflüssigkeit stamme aus den Gefäßen der Area pellucida

und nicht allgemein aus den embryonalen Gefäßen, kann auch deshalb nicht ganz stichhaltig sein, weil mit der voranschreitenden Entwicklung die Bedeutung der Area pellucida als frühembryonales Gefäß-Areal verloren geht. Das Volumen der Amnionflüssigkeit strebt hingegen weiterhin einem Maximum zu.
Dafür können folglich nur die vitellinen Gefäße in Frage kommen. Das Transsudat sollte allerdings, nach der allgemeinen Definition, wegen der aus irgendeinem Grund erhöhten Durchlässigkeit der Gefäßwände, unter anderem auch eine ähnliche Aminosäurezusammensetzung wie das Blut aufweisen. - Dies könnte man vom physiologischen Standpunkt aus nicht als eine Verschwendung bzw. als sinnlos bezeichnen, wenn man an die diätische Bedeutung der Amnionflüssigkeit denkt, die während der Hühnerembryogenese von etwa dem 12. Tage an zur Geltung kommt. - Wir müssen aber trotzdem, mit dem Hinweis auf unsere unterschiedlichen Aminosäure-Befunde, den Gedanken einer derartigen Erklärung für die Entstehung der Amnionflüssigkeit mindestens in Frage stellen.

Für den Hühnerembryo wird durch diese Vorgänge auf alle Fälle ein aquatiles Lebensmilieu geschaffen, das man mit guten Gründen mit dem ursprünglichen Lebensmedium des Urmeeres verglichen hat. - Hier haben wir es mit einem möglichen Beispiel zu tun, wo neben dem phylogenetischen Geschehen, auch die uralten Umgebungsbedingungen, in denen einmal das Leben entstanden ist, rekonstruiert werden.

d) Die Rolle der -SH-Gruppen bei der Morphogenese nach J. Brachet

Auf die Rolle der -SH-Gruppen bei der Morphogenese hat J. Brachet mit seiner Arbeitsgruppe zwischen 1951-61 in nicht weniger als 10 Mitteilungen hingewiesen. - Eine der letzten Veröffentlichungen des besagten Arbeitskreises ist der Hühnerembryogenese gewidmet, wo die wichtige Aufgabe des Neuralrohrverschlusses den Sulfhydryl-Gruppen zugeschrieben wird (27). Der Neuralrohrverschluß fällt in die ersten 33 Stunden der Inkubation (12-Somiten-Stadium); diese Tatsache könnte für uns, wenn auch nicht eine restlose Erklärung, so doch eine Arbeitshypothese bieten, weshalb wir am 3. 6. und 9. Tag nur im Eigelb - als Hauptnährflüssigkeit in der ersten Entwicklungshälfte - schwefelhaltige Aminosäuren finden konnten. Es dürfte somit eine regulatorische Rolle diesen Aminosäuren in der ersten Entwicklungsphase zuerkannt werden.

Für eine spezielle Rolle weiterer Aminosäuren - wie sie einige Autoren bei bestimmten Tier- oder auch Zellarten postulieren ("essentielle Aminosäuren") (44, 17, 4) - konnten wir auf Grund der vorliegenden Befunde keine Hinweise finden.

e) Zäsuren am 6. (?) und 12. Entwicklungstag

In allen untersuchten extraembryonalen Flüssigkeiten an den Gesamtaminosäuregehaltsveränderungen läßt sich um den 12. Tag ein Wendepunkt erkennen. - Etwa in diesem Zeitpunkt wird ein Stadium der Hühnerembryogenese erreicht, das für die Vogel-

entwicklung im allgemeinen als kritisch bezeichnet werden kann. Von nun an sind die gestaltlichen Voraussetzungen für ein autonomes Vogelleben gegeben. Wie A. Portmann betonte (28), ist das der früheste Zeitpunkt, den wir kennen, in dem eine Vogelart zum Schlüpfen überhaupt bereit ist. H.M. Eppenberger hat in seiner Dissertation dieses Stadium auch als eine Zäsur bezeichnet, in der die relativen Enzymaktivitäten, in dem sich entwickelnden Hühnerembryo bereits die Adultwerte erreichen können (6).

Im Eigelb manifestiert sich diese Zäsur schon vom 9. Tage an in einer massiven Abnahme der Kosmopoliten-Menge (S. Abb. 6 - knickartige Wendung der F_{korr}-Kurve), die am 12. Tag auch von einer Trockengehaltabnahme (Tg-Kurve) gefolgt wird. Der Eindruck von der Existenz dieses Wendepunktes verstärkt sich auch bei der Betrachtung der Eiklar Kurven (Abb. 8). Die Kosmopoliten-Menge und der Trockengehalt nehmen am 12. Tag, nachdem sie etwa 6 Tage lang (zwischen 6. - 12. Tag) konstant blieben, einen steilen Abfall. Im Amnion sieht man den Wendepunkt besonders am massiven Anstieg des Trockengehaltes (Abb. 12).

In der Allantois kann man diese Zäsur am Anstieg der Kosmopoliten-Menge beobachten (Abb. 12). Er ist enorm; die Aminosäureausscheidung erhöht sich in der Entwicklungsperiode vom 12/15. Tag von 830 γ auf 3210 γ. (Die Menge am 6. Tag betrug nur etwa 158 γ) (S. Tab. 12). - Ob hier die funktionelle Ablösung des Mesonephros durch die definitive Niere eine Rolle spielt,

oder ob dabei eine Manifestation für die vollzogene Strukturierung der Körperproteine beim werdenden Hühnchen zum Ausdruck kommt, das von jetzt an mit den zugeführten Aminosäuren - könnte man sagen - verschwenderischer umgehen kann, läßt sich vorderhand nicht sagen. Uns scheint es, daß beide Überlegungen am Platze sind. - Auch die Trockensubstanzgehaltsänderungen der Allantois nehmen vom 12. Tage an einen Verlauf, der auf eine etwas andersartige Exkretion hindeutet. Der Trockensubstanzgehalt wird vom 6. bis zum 12. Tag etwa 25mal erhöht, und nimmt dann eher ab, was wir mit einer anfänglichen Resorption zu erklären versuchen.

Die Zäsur am 12. Tag kommt auch im zeitlichen Querschnitt über die Kompartimente zum Ausdruck (Vgl. Abb. 14 und 15 - sowie die dazugehörenden Kommentare).

Außer diesem Wendepunkt um den 12. Entwicklungstag zeichnet sich vielleicht noch eine Zäsur ab. Sie liegt etwa beim 6. Entwicklungstag und kommt besonders im Verlauf der F_{korr} und TG-Kurven von Eigelb und Eiklar zum Vorschein. Der steile Abfall an Kosmopoliten- und Trockengehalt hat hier sein erstes Tief erreicht. Er wird im Eiklar von einer fast 6 Tage lang dauernden scheinbaren "Stillegung" der Aminosäureproduktion gefolgt. Im Eigelb hingegen zeigt sich nach diesem Tiefpunkt ein neuer Aufschwung der Aminosäureproduktion (S. Abb. 6, 7, 8 und 9).

f) Die Existenz zweier Ernährungswege

Die neue Situation, die um den 12. Tag herum im Eiklar und Amnion entsteht (S. Abb. 1), hat uns in der Einleitung veranlaßt, die Existenz zweier Ernährungswege zu postulieren. Wir können kaum glauben, daß die neuentstandene Kommunikation zwischen Eiklar und Amnion bloße Diffusionserscheinungen zur Folge hat. - Es würde dann die so präzis bis in die kleinsten Einzelheiten abgestimmte Embryogenese zulassen, daß wichtige Eiweißstoffe ohne Auswahl, per Zufall, in die Amnionflüssigkeit hineingeraten können, wo sie nachher vom Embryo konsumiert werden.

Zum Belegen unserer Meinung können wir uns vorläufig nur auf wenige Tatsachen verlassen. Die wichtigste davon ist die schon in der Einleitung geschilderte Beobachtung, daß nur 30 % des Eiklares via Eigelb aufgenommen werden (24). Sie steht auch damit in Einklang, daß im Eigelb durch den Dottersack-Umbilicus eingedrungenes mit Trypanblau gefärbtes Eiklar nachgewiesen worden ist (13). Das im Eiklarsack zurückbleibende, für eine orale Aufnahme reservierte Eiweißmaterial (70 %), dürfte sich durch irgendein stoffliches Kriterium vom Anteil unterscheiden, der via Eigelb konsumiert wird.

Es bleibt eine Aufgabe der Zukunft, solche stoffliche Unterschiede aufzufinden und damit weitere Beiträge zur Abklärung des embryologischen Geschehens zu liefern.

V. Zusammenfassung

- 1. Der prozentuale Trockensubstanzgehalt und die Frischgewichte der extraembryonalen Flüssigkeiten während der Hühnerembryogenese sind ermittelt worden.

- 2. Im Eigelb, Eiklar, Amnion und in der Allantois sind die Veränderungen des Aminosäuregehaltes am 3., 6., 9., 12. und 15. Entwicklungstag untersucht worden. - Neben Aminosäuren, die in allen untersuchten extraembryonalen Flüssigkeiten vorkommen und die wir "Kosmopoliten" nennen, gibt es einige, die für die einzelnen Eikompartimente in bestimmten Entwicklungsphasen charakteristisch sind.

- 3. Im Eiklar unbefruchteter Eier wurden etwa 10-12 Aminosäuren nachgewiesen. Die Charakteristik der zeitlichen Aminosäuregehaltsänderung ist im unbefruchteten Ei anders als im befruchteten.

- 4. Es wird über eine semiquantitative Auswertungsmöglichkeit der dünnschichtchromatographischen Analyse von DNP-Aminosäure-Mischungen berichtet.

- 5. Die pro Ei ermittelten zeitlichen Aminosäure- und Trockengehaltsänderungen in den extraembryonalen Flüssigkeiten lassen im Eigelb, Eiklar, Amnion und in der Allantois einen besonders ausgeprägten Wendepunkt etwa um den 12. Tag erkennen.

- 6. Die Hypothese nach Giacomini, wonach die Amnionflüssigkeit als Transsudat aus den Blutgefäßen der Area pellucida aufgefaßt wird, ist in Frage gestellt.

- 7. Zwei prinzipiell wesentlich verschiedene Ernährungswege in der Hühnerembryogenese werden diskutiert.

VI. Literatur

1. Aggazotti A.: Arch Ital. de Biol. 72. 127. (1923)
2. Brenner M, A. Niederwieser, G. Pataki: Experientia 17. 145. (1961)
3. Drell K.O.: Biokhimiya 24. 364. (1959)
4. Deutchar E.M.: J. Embriol nd Exptl. Morphol. 4. 327. (1956)
5. Emanuelsson H.: Nature 168. 958. (1951)
6. Eppenberger H.M.: Inauguraldissertation Basel (1962)
7. Fahmy A.R., A. Niederwieser, G. Pataki und M. Brenner: Helv. Chim. Acta 44. 2022. (1961)
8. Fiske C.H. and Boyden E.A.: J.B.C. 70 535 . (1926)
9. Frodyma M.M. and Frei R.W.: J. Chrom. 15. 501. (1964)
10. Giacomini E.: Boll. soc. ital. biol sper. 5. 343. (1930)
11. Hamburger V. and H.L. Hamilton: J. Morph. 88. 49. (1951)
12. Harkmark W. and K. Graham: Avhandlinger utgift av der Norske Videnskaps-Akademi i Oslo (1953)
13. Hanan E.B.: Am. J. Anat. 38. 423. (1927)
14. Kamei T.: Zeitschr.f.physiol.Chem. 171. 101.(1928)
15. Karczewski W.: Medycyna weterynaryjna 18. 619. (1962)
16. Koga G.: Biochem. J. 141. 430. (1923)
17. F. Leuthardt: Lehrbuch der Physiol. Chemie. Walter de Gruyter u. Co. (1959)
18. Lillie F.R.: Development of the chick. Holt, Rinehart and Winston. N.Y. (1952)
19. Lineweaver H. and Murray C.W.: J.B.C. 171, 565. (1947)
20. Lineweaver H., Morris H., Kline L. and Bean R.S.: Arch. Biochem. and Biophys. 16. 3. 443. (1948)

21. Lineweaver H. Fraenkel-Conrat H. and Bean R.S.: J.B.C. 177. 205. (1949)

22. Mandeles S.: J. Chrom. 3. 256. (1960)

23. Moore S., D.H. Spackman and W.H. Stein: Anal. Chemistry 30. 7. 1185 (1958)

24. Mc Indoe W.M.: J. Embryol. Exptl. Morphol. 8. Pb. 1. 47. (1960

25. Needham J.: Chemical Embryology. Cambridge, at the University Press (1931)

26. Pedersen K.O. and L.O. Andersson: Acta Chem Scand. 17. 871. (1963)

27. Pohl V. et J. Brachet: Dev. Biol. 4. 549. (1962)

28. Portmann A.: Viertelj. schw. Naturforsch. Gesellschaft Zürich 104. 200. (1959)

29. Randles C.A.: Inauguraldissertation, Cornell Univ., Ithaca N.Y. 92pp (1951)

30. Randles C.A. and Romanoff A.L.: Arch. Biochem. and Biophys. 49. 160. (1954)

31. Remotti E.: Richerch morfol. 9. 343. (1930)

32. Romanoff A.L. and F.W. Hayward: Biol. Bull. 141. 84. (1943)

33. Romanoff A.L. and Romanoff A.J.: The avian egg. Chapman u. Hall Ltd. London (1949)

34. Romanoff A.L.: The avian embryo. The Macmillan Company New York (1960)

35. Rupe O.O. and Farmer C.J.: J.B.C. 213. 899. (1955)

36. Schenck E.G.: Hoppe Seyl. Z. 211. 111. (1932)

37. Spackmann D.H., W.H. Stein and S. Moore: Anal. Chemistry 30. 7. 1190 (1958)

38. Stampfli H.R.: Rev. suisse. Zool. 57. 237. (1950)

39. Vrbitch S.: Comptes. Rend. Soc. Biol. 91. 604. (1924)

40. Yuki Ito: Acta embryol. et morphol. expt. (Palermo) 1. 118. (1957)

41. Walz D., A.R. Fahmy, G. Pataki, A. Niederwieser und M. Brenner Experientia 19. 213. (1963)

42. Williams M.A., W.A. DaCosta et al.: Nature 173. 490. (1954)

43. Winter C.G. and H.N. Christensen: J.B.C. 239. 872. (1964)

44. Nickerson W.J.: Biochemistry of Morphogenesis Symposium VI. Pergamon Press (1958)

curriculum vitae

Name: Kovàcs Sàndor Tamàs
geboren in Budapest am 7. September 1932
Religion: Calvinist
Name des Vaters: Dr. Kovàcs Sàndor (Beruf: Polizeimajor)
Schulbildung: 4 Jahre Primarschule
6 Jahre humanistisches Gymnasium
Besuchte Universitäten: Budapest, Bern, Basel
Abgeschlossene Fächer: Chemie, Botanik, Pharmakologie und Zoologie.

1950. Matura. Immatrikuliert an der Universität (Eötvös LoràND Tudomànyegyetem) Budapest.
1951. Tod des Vaters im Gefängnis (als politischer Gefangener). Sechs Wochen später wurde ich mit meiner Mutter aus Budapest deportiert. Mein Studium wurde unterbrochen.
1953. Nach anderthalbjähriger Deportation war ich Zwangsarbeiter im Militärdienst (ohne militärische Ausbildung).
1955. Nach 26 monatigem Dienst, - Befreiung von der Deportation durch die Regierung Imre Nagy. Wiederaufnahme des Studiums mit Stipendium an der Universität Budapest.
1956. Nach 6 - mit gutbestandenen Prüfungen abgeschlossenen Semestern - ist das Studium wieder unterbrochen. - 30. November, Ankunft mit der Mutter in der Schweiz.
1957. Sommersemester. Wiederaufnahme des Studiums an der Universität Bern.
1962. Anfang der Doktorarbeit in der Organisch-chemischen Anstalt der Universität Basel, unter der Leitung von Professor Dr. Max Brenner und Professor Dr. Adolf Portmann.

Besuchte Vorlesungen und Praktika bei den folgenden Dozenten:
Budapest: E.Biro, E.Dudich, B.Faludi, Gy.Gróh, A.Haraszty, B.Jàmbor, K.Kovàcs, G.Mödlinger, E.Schulek, R.Soó.
Bern: W.Feithknecht, K.Grob, F.E.Lehmann, M.Lüscher, E.F.Lüscher, Aàvon Muralt, W.Schopfer, R.Signer, R.Weber.
Basel: K.Bernhard, M. Brenner, K.Bucher, R.Geigy, H.Labhart, A.Portmann, T.Reichstein.

Genehmigt von der Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät auf Antrag der
Herren Professoren Dr. A. Portmann und
Dr. M. Brenner

Basel, den 10. Mai 1966

Prof. Dr. W. Habicht
Dekan